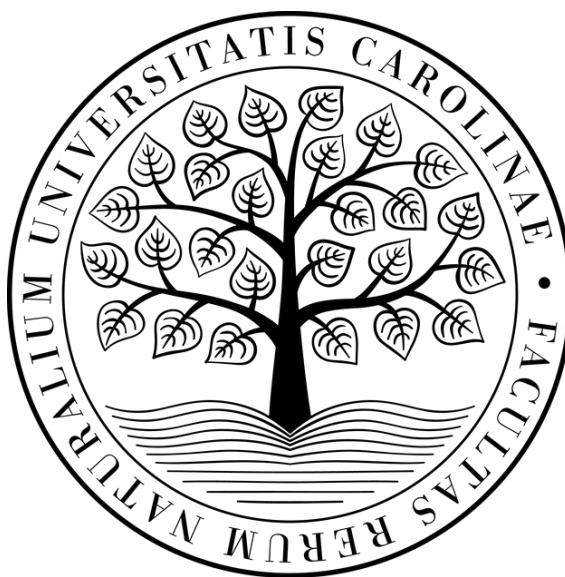


Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Kristýna Šintáková

Role mTOR dráhy v neurální diferenciaci kmenových buněk
The role of mTOR signalling pathway in neural differentiation of stem cells

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavla Jendelová, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Nataliya Romanyuk, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 8. 2021

Podpis

Poděkování

Ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Pavle Jendelové, Ph.D. a konzultantce Mgr. Nataliyi Romanyuk, Ph.D. za vedení diplomové práce a veškerou pomoc a čas, který mi věnovaly při jejím vypracování. Dále bych ráda poděkovala kolegům z Oddělení regenerace nervové tkáně, především Mgr. Ivanu Arzhanovovi a Bc. Zuzaně Čermákové za neocenitelné rady a pomoc v laboratoři. Děkuji MUDr. Lucii Machové Urdzíkové, PhD. za indukci míšních lézí a MUDr. Karolině Turnovcové, PhD. za analýzu cytokinů.

Děkuji mé rodině za bezpodmínečnou podporu a trpělivost během mého studia a sepsování této práce.

Práce byla vypracována jako součást grantu: Studium signálních drah spojených se sekundární reakcí, tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů a zánětu při poranění míchy a následné regeneraci (LTAUSA17120).

Abstrakt

Poranění míchy je velice závažný, komplexní a život zničující úraz, pro který dnešní medicína stále nemá účinnou léčbu. Je možné pouze tlumit následky poranění a patologické děje s ním spojené. Transplantace neurálních kmenových buněk má v patologii míšního poranění imunosupresivní účinky a podporuje regeneraci. mTOR kináza je součástí klíčové intracelulární signální dráhy PI3K/Akt/mTOR, což z ní dělá vhodný cíl terapeutického zásahu a imunosupresiv, například rapamycinu. mTOR signalizace je důležitá pro neurální kmenové buňky a v patologii míšního poranění.

Cílem této práce bylo zkoumat úlohu mTOR dráhy v diferenciaci kmenových buněk do neurálního fenotypu. Na kultury neurálních progenitorů *in vitro* byl aplikován rapamycin, a pomocí metod imunocytochemie a imunoblotování byl sledován vliv inhibice na buněčný fenotyp a aktivitu mTOR dráhy. V *in vivo* potkaních modelech míšního poranění byl technikami imunohistochemie a imunoblotování vyhodnocen dopad inhibice rapamycinem na mTOR dráhu, autofagii a produkci cytokinů buňkami poškozené tkáně.

Výsledky ukazují, že mTOR dráha se účastní diferenciaci neurálních prekursorů do neuronálního fenotypu *in vitro*, rapamycin inhiboval mTOR dráhu *in vitro* a *in vivo*, podpořil tok autofagie a ovlivnil produkci zánětlivých cytokinů v míšní tkáni.

Klíčová slova: kmenové buňky, iPSC, neurální diferenciaci, rapamycin, mTOR

Abstract

Spinal cord injury is a very serious, complex, and life changing injury for which today's medicine still does not have an efficient treatment. It is only possible to mitigate the consequences of this injury and the pathological processes associated with it. Neural stem cell transplantation has immunosuppressive effects in the pathology of spinal cord injury and promotes regeneration. mTOR kinase is a member of the crucial intracellular PI3K/Akt/mTOR signalling pathway, making it a suitable target for therapeutic intervention and immunosuppressants such as rapamycin. mTOR signalling is important for neural stem cells and in the pathology of spinal cord injury.

The aim of this study was to investigate the role of the mTOR pathway in differentiation of stem cells into neuronal phenotype. Rapamycin was applied to *in vitro* culture of neural progenitors. Immunocytochemistry and immunoblotting techniques were used to study the effect of this inhibition on the cell phenotype and on the activity of the mTOR pathway. Using the rat model of spinal cord injury *in vivo*, immunohistochemistry and immunoblotting techniques were used to evaluate the impact of rapamycin inhibition on the mTOR pathway, autophagy, and cytokine production by cells in the damaged tissue.

The results show that the mTOR pathway plays role in neural progenitor differentiation into neuronal phenotype *in vitro*, rapamycin inhibited the mTOR pathway *in vitro* and *in vivo*, promoted the autophagy flux, and had an effect on the production of inflammatory cytokines in spinal cord tissue.

Key words: stem cells, iPSC, neural differentiation, rapamycin, mTOR

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1. Úvod	14
2. Literární přehled	15
2.1. Poranění míchy	15
2.1.1. Úvod do patologie	15
2.1.2. Fáze SCI	16
2.1.3. Patologické procesy SCI	17
2.1.4. Zvířecí modely SCI	22
2.1.5. Experimentální a terapeutické postupy v léčbě SCI	23
2.2. mTOR	26
2.2.1. Charakteristika a struktura mTOR	26
2.2.2. Signální dráha mTOR	29
2.2.3. Rapamycin	33
2.3. Neurální kmenové buňky	34
2.3.1. Charakterizace a vlastnosti NSC	34
2.3.2. mTOR a jeho signální dráha v NSC	36
2.3.3. Terapeutické využití NSC v patologii SCI	37
3. Cíle diplomové práce	39
4. Materiál a metody	40
4.1. Metody buněčného experimentu	40
4.1.1. Kultivace buněk	40
4.1.2. Imunocytochemie	41
4.1.3. Analýza buněk Western Blot	44
4.2. Metody <i>in vivo</i> experimentu	46
4.2.1. Indukce míšního poranění u potkanů	46
4.2.2. Analýza tkáně Western Blot	47
4.2.3. Imunohistochemie	47
4.2.4. Analýza cytokinů	48
4.3. Statistické vyhodnocení dat	49
5. Výsledky	50
5.1. Buněčný experiment	50
5.2. In vivo experiment	61
6. Diskuse	65

7. Závěr.....	75
Seznam použité literatury	76

Seznam použitých zkratek

4E-BP1	vazebný protein 1 eukaryotického faktoru iniciace translace 4 (eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1)
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BDNF	neurotrofický faktor odvozený od mozku (brain derived neurotrophic factor)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
BSCB	bariéra mezi krví a míchou (blood-spinal cord barrier)
CNS	centrální nervová soustava, centrální nervový systém (central nervous system)
COX-2	cyklooxygenáza 2 (cyclooxygenase)
CSPGs	chondroitin sulfát proteoglykany (chondroitin sulfate proteoglycans)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DEPTOR	DEP domain containing mTOR interacting protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DTT	1,4-dithiothreitol
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
eIF4E	eukaryotický iniciační faktor translace 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E)

epSPC	ependymální kmenové/progenitorové buňky (ependymal stem/progenitor cells)
FAT	fokální adhezivní doména (focal adhesion targeting)
FATC	C-koncová FAT doména (FAT C-terminus)
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
Fox	forkhead box
Foxo	Fox třídy O
FRAP	FKBP12-rapamycin asociovaný protein (FKBP-rapamycin associated protein)
FRB	rapamycin vázající doména FKB12 (FKBP rapamycin binding)
GAP	GTPázu aktivující protein (GTPase-activating protein)
GβL	G beta protein subunit-like
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte colony-stimulating factor)
GFAP	gliální fibrilární acidický protein (glial fibrillary acidic protein)
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
HIF-1	hypoxií indukovatelný faktor 1
HRP	avidin-peroxidáza (horseradish peroxidase)
ICAM-1	intercelulární adhezivní molekula 1 (intercellular adhesion molecule 1)
ICC	imunocytochemie (immunocytochemistry)

IFN- β	interferon beta
IFN- γ	interferon gama
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
IHC	imunohistochemie (immunohistochemistry)
IL-1	interleukin 1
IL-1 β	interleukin 1 β
IL-2	interleukin 2
IL-4	interleukin 4
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IL-10	interleukin 10
IL-17	interleukin 17
iNOS	inducibilní NO syntáza (inducible nitric oxide synthase)
iPSC-NPs	neurální prekursorů odvozené od indukovaných pluripotentních kmenových buněk (induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors)
IRS	substrát insulinového receptoru (insulin receptor substrate)
kDa	kilodalton
MAP2	protein asociovaný s mikrotubuly 2 (microtubule-associated protein 2)
MIP-1 α	makrofágový zánětlivý protein (macrophage inflammatory protein)

mLST8	mammalian lethal with Sec13 protein 8
MSC	mesenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase [SAPK]-interacting protein
mTOR	savčí/mechanický cíl rapamycinu (mammalian/mechanistic target of rapamycin)
mTORC1	mTOR komplex 1 (mTOR complex 1)
mTORC2	mTOR komplex 2 (mTOR complex 2)
NF-H	neurofilament H
NGS	normální kozí sérum (normal goat serum)
NK	natural killers
NSC	neurální kmenové buňky (neural stem cells)
NSC/NPC	neurální kmenové/prekurzové buňky (neural stem/progenitor cells)
OPC	progenitory oligodendrocytů (oligodendrocyte progenitor cell)
Pax6	paired box 6
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (phosphate-buffered saline)
PDK1	protein 3-fosfoinositid dependentní protein kináza 1 (phosphoinositide-dependent kinase-1)
PFA	paraformaldehyd
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza

PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate)
PKC α	proteinkináza C alfa (protein kinase C alpha)
PRAS40	proline-rich Akt substrate of 40 kDa
PROTOR 1/2	protein observed with RICTOR1/2
PTEN	phosphatase and tension homolog
PTP σ	protein tyrosin fosfatáza σ (protein tyrosine phosphatase σ)
RA	kyselina retinová (retinoic acid)
RAFT	rapamycin a FKBP12 asociovaný protein (rapamycin- and FKBP12-associated protein)
RAPTOR	regulatory-associated protein of mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RICTOR	rapamycin insensitive companion of mTOR
RIPA	RIPA pufr (radioimmunoprecipitation assay buffer)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
S6K	ribosomální proteinkináza S6
SCI	poranění míchy, míšní léze (spinal cord injury)
SDS	dodecylsírán sodný
SGZ	subgranulární zóna
SHH	Sonic hedgehog protein

Sox2	sex determining region Y (SRY) - box 2
SPC-01	spinální neurální prekuzory (spinal neural precursors)
SVZ	subventrikulární zóna
TBST	směs tris-pufrovaného solného roztoku a polysorbátu 20 (Tris-Buffered Saline and Tween 20)
TOS	signální motiv TOR (TOR signalling)
TSC	komplex proteinů tuberózní sklerózy (tuberous sclerosis complex)
VCAM-1	vaskulární buněčná adhezní molekula 1 (vascular cell adhesion molecule 1)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VPA	kyselina valproová (valproic acid)

1. Úvod

Míšní poranění je závažný úraz centrální nervové soustavy s celoživotními následky a komplexní patologií, na které se podílí mnoho buněčných typů, mediátorů zánětu a signálních drah. Dochází k devastujícímu poškození tkáně, a to jak při samotném poranění, tak při následných zánětlivých dějích. Dalším následkem je ztráta motorických a senzorických funkcí. Regenerace je omezena kvůli malé regenerační kapacitě centrálního nervového systému, tvorbou kavit a gliové jizvy. Navzdory pokrokům v posledních letech stále neexistuje efektivní léčba, a většina terapeutických přístupů se soustředí především na mírnění následků úrazu. Experimentální přístupy léčby zahrnují podávání imunosupresiv, tkáňové inženýrství a buněčné terapie. Bylo popsáno, že transplantace neurálních kmenových buněk, případně jejich prekursorů má v patologii míšního poranění neuroprotektivní, imunosupresivní a protizánětlivý účinek. Je podpořena regenerace a transplantované buňky jsou schopny se diferencovat do různých buněčných typů nervové tkáně.

mTOR je serin/threoninová kináza, která je součástí klíčové intracelulární signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Vyskytuje se ve dvou multiproteinových komplexech, z nichž jeden je citlivý na inhibici rapamycinem. mTOR integruje podněty z prostředí a v odpověď na ně řídí buněčný růst a metabolismus řadou buněčných procesů. Signalizace je důležitá v mnoha buněčných dějích i patologiích, a to včetně poranění míchy. Také hraje roli v neurálních kmenových buňkách a má vliv na procesy neurogeneze a udržování pluripotence. Důležitost mTOR dráhy pro neurální kmenové buňky je nepopíratelná, ovšem na to, jak přesně se dráha na dějích v buňkách podílí, není jednotný názor. Týká se to především jejího vlivu na proliferaci neurálních kmenových buněk a na jejich diferenciaci do dalších buněčných typů neurální linie.

Cílem této práce je studium vlivu rapamycinu na mTOR dráhu v neurálních kmenových buňkách a na jejich diferenciaci do buněk neurální linie. Pokusíme se zjistit, jak je ovlivněna proliferace a diferenciaci a zda dochází k diferenciaci do neurálního, nebo do gliálního fenotypu. Také analyzujeme vliv inhibice rapamycinem na mTOR dráhu, autofagii a produkci cytokinů v míšní tkáni po poranění.

2. Literární přehled

2.1. Poranění míchy

2.1.1. Úvod do patologie

Poranění míchy, neboli míšní léze, anglicky spinal cord injury (SCI), je velice závažný úraz centrální nervové soustavy (CNS). Příčina SCI může být netraumatického nebo traumatického původu. Příkladem netraumatického poškození míchy je komprese, ke které dochází v důsledku vaskulární ischemie nebo nádoru. Traumatické SCI je častější. Úraz páteře a s ním spojené vymknutí nebo zlomení obratle bývá zapříčiněn vnější silou, například nárazem v důsledku pádu (Ahuja, Wilson, et al., 2017; McKinley et al., 1999). Průběh SCI je poměrně komplexní a lze ho z hlediska času rozdělit do dvou fází, kdy po primárním traumatickém poranění následuje kaskáda dějů sekundárního poranění. Dochází k ischemii, proapoptotické signalizaci a migraci buněk zprostředkovávajících zánět z periferie do místa poranění. Následuje uvolnění prozánětlivých cytokinů a cytotoxických částic, například nukleových kyselin (DNA), adenosintrifosfátů (ATP) a reaktivních forem kyslíku (ROS). Všechny tyto děje přispívají k zánětlivému prostředí v místě poranění. Vzniká gliová jizva, která obklopuje splynulé cystické kavity a s přechodem poranění do chronické fáze omezuje možnosti regenerace (Ahuja, Nori, et al., 2017). Narušení bariéry mezi míchou a krví (BSCB) vede k akumulaci zánětlivých cytokinů (Ren et al., 2018). Přetrvávající zánětlivá odpověď přispívá k rozšíření poškození i do zdravých tkání v okolí léze, a tím i ke zvýšení neurologických deficitů (Amo-Aparicio et al., 2018). SCI je provázeno dočasnými, nebo i trvalými změnami ve funkci míchy. Může se jednat o ztrátu motorických, autonomních a senzorických funkcí (R. J. Dumont et al., 2001).

Přestože v posledních letech došlo k obrovským pokrokům jak v diagnóze této patologie, tak v péči o pacienty, možnosti efektivní léčby SCI jsou stále nedostatečné (Alizadeh et al., 2019). Špatná prognóza při SCI souvisí s velmi omezenou regenerační kapacitou míchy. Dospělá mícha má totiž jen velmi omezenou schopnost tvořit nové neurony nebo regenerovat poškozené nervové buňky. V posledních letech bylo sice dokázáno, že CNS má větší regenerační kapacitu, než se původně myslelo, ale tato kapacita je velmi omezená, a řádově nižší než u periferního nervového systému. Také se

sníží s věkem (Ahuja, Nori, et al., 2017). Dalším problémem při léčbě SCI je komplexnost poranění. To má několik fází a dochází při něm k mnoha patologickým dějům (obr. 1). Jedná se například o buněčnou smrt, demyelinizaci a tvorbu gliové jizvy (Hayta & Elden, 2018). V současnosti existuje mnoho léčebných postupů SCI, od podávání kortikoidů a experimentálních imunosupresiv, buněčnou terapii, až po tkáňové inženýrství (C. M. Dumont et al., 2016; Yilmaz & Kaptanoğlu, 2015). Všechny tyto terapeutické přístupy ale pouze cílí na projevy a následky SCI; samotné SCI současná medicína vyléčit neumí.

2.1.2. Fáze SCI

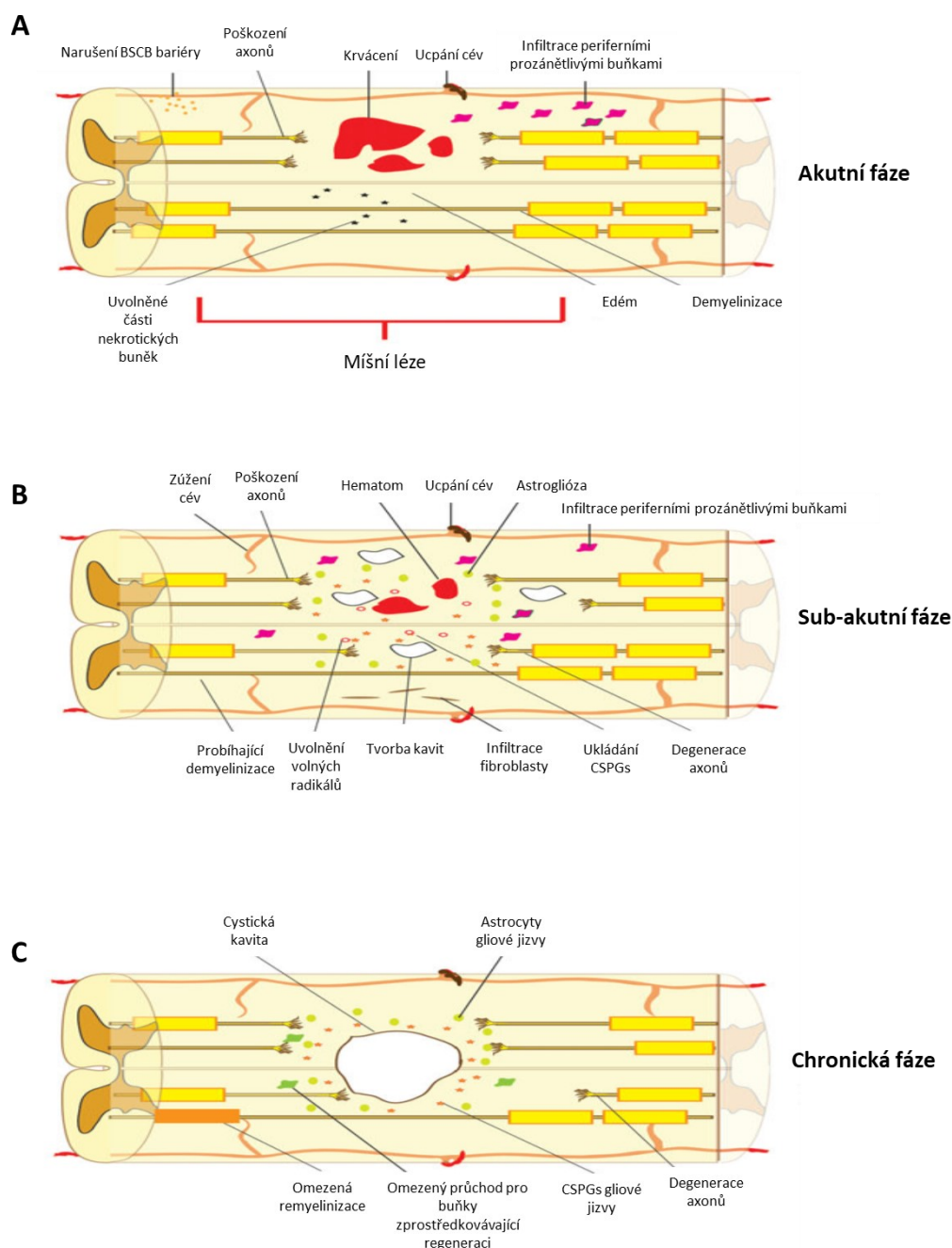
Jak bylo řečeno výše, SCI lze rozdělit z časového hlediska do dvou fází. Primární poranění je způsobeno prvotním úrazem. Dochází ke zlomeninám obratlů, fragmentaci meziobratlových plotének a poškození nebo i přerušení míchy. Zda došlo k úplnému nebo neúplnému přerušení je důležité z hlediska prognózy (Dumont et al., 2001; Oyibo, 2011), i když u většiny zranění k úplnému přerušení míchy nedojde (Alizadeh et al., 2019; Tator and Fehlings, 1991). Nejčastější podobou primárního poranění je náraz s přetrvávající kompresí, jejíž příčinou jsou většinou tříštivé zlomeniny a fragmenty kosti tlačící na míchu. Může také dojít ke zlomeninám v kombinaci s vykloubením (R. J. Dumont et al., 2001). V řádu prvních týdnů nebo až měsíců po poranění může dojít k samovolnému zotavení některých motorických a senzorických funkcí, ovšem dlouhodobá rekonvalescence závisí na rozsahu a závažnosti primárního poranění a progresi do sekundárního poranění. Poškození cév a krvácení při primárním poranění vede k narušení cévního zásobení míchy. Jedná se o jeden z prvních následků primárního poranění, který dále vede k vaskulárním změnám, redukci průtoku krve a k trombóze. Tyto procesy jsou doprovázeny ischemií a hypoxií, které během akutní fáze sekundárního SCI vedou k nekrotické smrti buněk a s ní související excitotoxicitě. Důsledkem nedostatečného krevního zásobení a trombózy je také poškození funkce BSCB, která může být narušena už při primárním poranění. Tyto procesy vedou k prohlubování zánětu (Couillard-Despres et al., 2017; Silva et al., 2014).

Patologie sekundárního poranění byla poprvé popsána v roce 1911 (Allen, 1911) a je z hlediska patofyziologických procesů klíčovou fází SCI (Silva et al., 2014). Rozvíjí se po primárním poranění v řádu minut a může pokračovat několik týdnů až měsíců. Lze ho

charakterizovat jako zánětlivou kaskádu dějů na buněčné i molekulární úrovni, během které dochází k progresivnímu poškození míšní tkáně a okolí místa léze (obr. 1). Akutní fáze začíná ihned po primárním poranění míchy. Dochází při ní k narušení rovnováhy hladin iontů, excitotoxicitě a tvorbě volných radikálů. Astrocyty a mikroglie jsou aktivovány a spolu s buňkami imunitního systému produkují prozánětlivé cytokiny jako jsou interleukiny 1β (IL- 1β) a 6 (IL-6) a faktor nádorové nekrózy α (TNF- α). Ve výsledku všechny tyto děje vedou k rozvoji edému a přispívají k dalšímu rozvoji zánětu (Fehlings, Vaccaro, & Boakye, 2012; Oyinbo, 2011; Siddiqui et al., 2015). Dysfunkce mitochondrií, s tím související oxidativní stres a snížení hladin ATP spolu s dysregulací autofagie má za následek smrt neuronů (Alizadeh et al., 2019). S dalším rozvojem poranění přechází akutní fáze do sub-akutní a pak do chronické (obr. 1). Axony jsou demyelinizovány, neurony a oligodendrocyty hynou apoptotickou buněčnou smrtí a dochází k další nekróze buněk. Vzniká cystická kavita, tvoří se gliová jizva (Oyinbo, 2011; Tran et al., 2018) a postupně dochází k částečné remyelinizaci. Při ní jsou nahrazeny především oligodendrocyty. Ty mohou být původem buď z progenitorů, nebo z endogenních neurálních kmenových buněk (NSC). Progenitorové oligodendrocyty se diferencují do myelinizujících oligodendrocytů. Takto remyelinizují axony, které přežily nebo zregenerovaly. Mnoho procesů kaskády sekundárního poranění se podílí na ztrátě oligodendrocytů při SCI (Alizadeh et al., 2015).

2.1.3. Patologické procesy SCI

Regenerace poškozené tkáně a oprava motorických funkcí je po SCI obecně velmi slabá. Hlavními příčinami jsou neuroinflamace, klíčový děj sekundární fáze SCI, a narušení rovnováhy míšního mikroprostředí po zranění. K narušení rovnováhy dochází na úrovni tkáňové, buněčné i molekulární. Na úrovni tkáňové probíhají procesy jako je ischemie, krvácení, demyelinizace a remyelinizace a také tvorba gliové jizvy. Na buněčné úrovni dochází k aktivaci buněk CNS, diferenciaci endogenních NSC a infiltraci buňkami imunitního systému. Poškozené neurony, astrocyty a další buňky uvolňují cytokiny a další faktory jako jsou IL- 1β , IL-6, TNF- α , interferon gama (IFN- γ), ATP, oxid dusný a růstové faktory. Uvolnění těchto mediátorů podporuje aktivaci mikroglie (Fan et al., 2018; Mortazavi et al., 2015) a neuroinflamaci.



Obrázek 1: Vývoj patologie míšního poranění. Akutní fáze poranění (A) probíhá prvních zhruba 48 hodin po zranění. Dochází k narušení bariéry mezi krví a míchou (BSCB), krvácení, edému a demyelinizaci. Uvolnění proapoptotických faktorů, jako jsou cytokiny, ionty a části apoptotických buněk přispívá k probíhající buněčné smrti. Poškození neuronů a oligodendrocytů vede k další ztrátě jejich funkce. Aktivované astrocyty infiltrují místo poranění, přinášejí chondroitin sulfát proteoglykany (CSPGs) a uvolňují prozánětlivé faktory. Akutní fáze přechází do sub-akutní (B), během které dochází k další apoptotické a nekrotické smrti buněk. Tvoří se cystické kavity, které s přechodem do chronické fáze (C) splývají a zabraňují regeneraci. Vzniká gliová jizva obsahující velké množství CSPGs, která působí jako fyzická a biochemická bariéra. Zabraňuje růstu neuritů a omezuje průchod buněk zprostředkovávajících regeneraci. Převzato a upraveno z Ahuja, Nori, et al., 2017.

Je tedy patrné, že na patologických a zánětlivých procesech v rámci SCI se podílí mnoho buněčných typů původem jak CNS, tak z přirozeného a adaptivního imunitního systému. Tyto buňky exprimují cytokiny a mediátory, které přispívají k prohlubování zánětu. Jedná se o neutrofily, mikroglie, astrocyty, dendritické buňky, krevní makrofágy a T a B lymfocyty (Donnelly & Popovich, 2008; Trivedi et al., 2006). Neurony míchy exprimují cytokiny během půl hodiny po SCI, mikroglie pak o několik hodin později (L. Yang et al., 2004). Aktivované mikroglie exprimují prozánětlivé cytokiny IL-1 α , IL-1 β , TNF- α (David & Kroner, 2011). Astrocyty sice nepatří přímo mezi imunitní buňky, ale v rámci CNS mají mnoho důležitých funkcí. Jsou klíčové v procesech neuroinflamace, sekretují TNF- α a IL-6, a za fyziologických podmínek se podílejí na udržování homeostázy CNS. Poskytují živiny a růstové faktory neuronům (Colombo & Farina, 2016; Fan et al., 2018).

Infiltrace místa poranění a okolní tkáně buňkami imunitního systému ještě více podporuje zánětlivé prostředí léze, a cytokiny produkované těmito buňkami se podílejí na procesu neurodegenerace (Glaser et al., 2004). Imunitními buňkami, které do místa poranění přicházejí jako první, jsou neutrofily. Do poškozené míchy se neutrofily dostanou vystoupením z krevního řečiště během prvních pár hodin a jejich počet je nejvyšší zhruba 24 hodin po zranění. Jejich přítomnost se týká především akutní fáze SCI (Neirinckx et al., 2014). Dalšími buňkami, které se dostávají do místa poranění po neutrofilech, jsou dvě populace makrofágů. Jedná se o rezidentní mikroglie a od monocytů odvozené makrofágy. Tyto buňky se podílejí na regeneračních i degeneračních procesech v míšní tkáni po SCI (X. Zhou et al., 2014) a to v závislosti na jejich fenotypu (Kong & Gao, 2017). Mikroprostředí míchy po SCI směřuje polarizaci makrofágů preferenčně do prozánětlivého M1 než do proregeneračního M2 fenotypu (Gensel & Zhang, 2015). V tomto směřování je důležitý cytokin IL-6, který podporuje aktivaci a polarizaci makrofágů do M1 fenotypu a do mikroglíí. Bylo experimentálně prokázáno, že časově omezená blokáda IL-6 signalizace po SCI potlačuje prozánětlivou aktivitu a také podporuje polarizaci makrofágů do proregeneračního fenotypu M2 (Guerrero et al., 2012). Součástí adaptivní odpovědi na SCI jsou T a B lymfocyty. Podobně jako makrofágy mají více různých fenotypů. Díky tomu mohou v odpověď na signály obdržené z mikroprostředí přispívat k zánětlivým nebo k hojivým procesům v SCI. Autoreaktivní T buňky mohou mít toxický účinek na neurony a gliové buňky

(Jones, 2014). Složení fenotypu buněk podílejících se na zánětlivých procesech SCI se tedy mění v závislosti na fázi poranění a signálů obdržených z mikroprostředí, a může být prozánětlivé nebo protizánětlivé (Alizadeh et al., 2019).

Jak již bylo zmíněno, v procesu neuroinflamace hraje roli mnoho cytokinů. Ty mohou být prozánětlivého nebo protizánětlivého charakteru (Ramesh et al., 2013). U některých prozánětlivých cytokinů záleží na tom, v jaké koncentraci jsou přítomny. V malých koncentracích mají neuroprotektivní vlastnosti, indukují expresi neutrofilů a aktivují endogenní kmenové buňky. Pokud je jejich hladina vysoká, dochází jejich působením k poškození neuronů. Cytokiny aktivují faktory, které podporují expresi neurotoxických genů. Jedná se například o enzym cyklooxygenázu 2 (COX-2), inducibilní NO syntázu (iNOS) a proteázu trombin (Fan et al., 2018).

Cytokiny, které vykazují pozitivní účinek při procesech SCI, jsou erythropoetin, faktory stimulující kolonie granulocytů (G-CSF) a granulocytů a makrofágů (GM-CSF), dále také interferony beta (IFN- β) a gama (IFN- γ) (Ren et al., 2018). Z interleukinů lze pak uvést interleukiny 4 (IL-4) a 10 (IL-10). IL-4 se podílí na aktivaci makrofágů a podporuje jejich diferenciaci do fenotypu M2. Také snižuje míru poškození tkáně (Francos-Quijorna et al., 2016). V případě IL-10 byl popsán neuroprotektivní účinek v modelech SCI. Jeho vlivem dochází ke snížení hladin prozánětlivých mediátorů včetně IL-1 β , IL-6, TNF- α a ROS (Thompson et al., 2013).

Negativní vliv na SCI patologii má prozánětlivý interleukin 1 (IL-1). Tento interleukin hraje roli v aktivaci makrofágů a mikroglíí po SCI. K aktivaci může docházet klasickou i alternativní cestou. Narůst hladiny mediátoru zánětu IL-1 β byl pozorován v experimentálních myších modelech SCI (C. X. Wang et al., 1997) i u lidských pacientů (L. Yang et al., 2004). Interleukin 17 (IL-17) v podmínkách SCI podporuje neuroinflamaci (Zong et al., 2014). TNF- α způsobuje excitotoxicitu a produkci NO. Exprese TNF- α je po SCI zvýšena v neuronech, gliích a endoteliálních buňkách. TNF- α indukuje expresi adhezivních molekul ICAM-1 a VCAM-1 a stimuluje uvolnění chemotaktického faktoru interleukinu 8 (IL-8). Díky tomu je podpořena infiltrace místa poranění neutrofily. Také má vliv na permeabilitu endoteliálních buněk, napomáhá rozvoji zánětu a podporuje apoptotickou buněčnou smrt neuronů, demyelinizaci oligodendrocytů a tvorbu gliové jizvy. Terapeutická suprese TNF- α podáváním

antagonistů v akutní fázi SCI vedla ke snížení míry apoptózy neuronů a demyelinizace axonů (K. B. Chen et al., 2011; Garcia et al., 2016; Le et al., 2014).

SCI má dopad na iontovou homeostázu. Poškozením buněčných membrán při poranění a uvolněním zánětlivých faktorů dochází ke změně selektivity iontových kanálů, pump a transportérů. Důsledkem toho je narušena homeostáza. Dochází k nerovnováze hladin iontů, především draselných, sodných a vápenatých. Takto vzniklá dysbalance má výrazný vliv na další patologické změny v míše po SCI. Koncentrace draselných iontů je zvýšena extracelulárně, u vápenatých a sodných iontů je koncentrace zvýšena intracelulárně. Akumulace sodných iontů v buňce má za následek vznik cytotoxického edému a stimulaci intracelulární fosfolipázové aktivity. Pro synaptický přenos nervového vzruchu jsou naprosto klíčové vápenaté ionty. Důsledkem narušení jejich rovnováhy při SCI dochází k intracelulární hyperkalcemii, poškození mitochondrií a k apoptotické nebo nekrotické buněčné smrti. K tomuto poškození jsou mezi buňkami CNS obzvláště náchylné oligodendrocyty (Fan et al., 2018; W. M. Liu et al., 2011; Schanne et al., 1979). Dalším iontem, který hraje důležitou roli v patologii SCI, je železo. Při SCI dochází ke krvácení, které zapříčiní akumulaci železa v extracelulárním prostoru. Železo pak přispívá k excitotoxicitě a tvorbě volných i kyslíkových radikálů, čímž inhibuje regeneraci tkáně po SCI (Emerit et al., 2001; Routhe & Moos, 2015).

Následkem SCI dochází ke smrti velkého množství buněk, ať už kvůli poranění nebo při zánětlivých dějích sekundárního poranění, které způsobují destrukci míšní tkáně. Je již dlouho známo, že buňky CNS při SCI umírají nekrotickou a apoptotickou buněčnou smrtí (Crowe et al., 1997). Tyto způsoby buněčné smrti lze pozorovat u neuronů a gliových buněk v místě léze během akutní fáze SCI (Zhang et al., 2012). Jako další typ buněčné smrti, ke které při SCI dochází, byla identifikována nekroptóza. Jedná se o programovou nekrózu (Dunai et al., 2011). K apoptóze dochází především v důsledku zvýšení hladiny vápenatých iontů, které aktivují apoptotické kaspázy a protein kalpain (Oyinbo, 2011). Nekroptóza a apoptóza mohou být také spuštěny oxidativním poškozením DNA kyslíkovými radikály uvolněnými z přítomných neutrofilů (Hausmann, 2003). Přítomné proapoptotické faktory, mezi které se řadí například draselné ionty nebo části nekrotických buněk, přispívají k probíhající buněčné smrti. Poškození a s tím související ztráta funkce neuronů a oligodendrocytů při zánětlivých

procesech v rámci sekundárního poranění je mnohem větší než při následcích primárního poranění.

Asi největší překážkou pro efektivní regeneraci a léčbu SCI je gliová jizva (Ahuja & Fehlings, 2016). Jedná se o fyzickou bariéru, která se tvoří okolo místa poranění a odděluje zdravou tkáň od tkáně poškozené při patologických a zánětlivých procesech SCI. Na jejím vzniku se podílejí především astrocyty. Tyto buňky CNS se aktivují, prolifерují a migrují do místa poranění, kde produkují chondroitin sulfát proteoglykany (CSPGs). Gliová jizva je nakonec vytvořena z hypertrofovaných astrocytů (Ahuja, Nori, et al., 2017; Pekny & Nilsson, 2005) a extracelulární matrix. Funkčně slouží gliová jizva jako ochranná bariéra, aby se imunitní buňky, které místo léze infiltrují v akutní fázi probíhajícího poranění, nedostaly i do okolní tkáně. Zároveň je tím ale znemožněna regenerace a růst axonů v pozdějších, chronických fázích SCI. Gliová jizva se tedy jeví jako ideální cíl terapeutického zásahu při léčbě SCI (Cregg et al., 2014; Yuan & He, 2013). Samotná struktura obsahuje fibrilární a gliální komponenty. Její součástí jsou také složky extracelulární matrix, a to především již zmíněné CSPGs. Tyto proteoglykany přispívají k inhibiční roli gliové jizvy v axonální regeneraci a remyelinizaci (Alizadeh et al., 2019), ale spíše než růst axonů inhibují růst oligodendrocytů (Dyck et al., 2018). Stejně jako další inhibiční proteiny jsou CSPGs produkovány astrocyty. Protein tyrosin fosfatáza σ (PTP σ), receptor pro CSPGs, se nachází na povrchu neuronů. Interakce mezi receptorem a jeho ligandem zamezuje pohybu axonálního růstového kužele. Tím je zabráněno, aby axony procházely přes gliovou jizvu. Receptor PTP σ hraje v prostředí SCI roli molekulárního přepínače, který definuje regenerativní kapacitu axonu. Z tohoto důvodu je inhibice PTP σ receptoru zkoumána jako možný cíl terapeutického zásahu (Pekny & Nilsson, 2005; Shen et al., 2009; H. X. Zhou et al., 2014). Prevence vzniku gliové jizvy ovšem nepodpoří regeneraci axonů po SCI. Bylo také zjištěno, že astrocyty odvozené od endogenních NSC podporují axonální regeneraci, zatímco fibroblasty inhibují průchod axonů gliovou jizvou (Anderson et al., 2016).

2.1.4. Zvířecí modely SCI

Míšní poranění je předmětem mnoha klinických studií a výzkumů, které využívají zvířecí modely pro objasnění mechanismů probíhajících v SCI. Zvířecí experimentální modely míšního poranění by měly mít především vlastnosti, které jsou relevantní

pro patofyziologii lidského SCI. Některé terapie pro léčbu akutní SCI sice vykazovaly nadějně výsledky ve zvířecích modelech, ale jejich účinnost se neprokázala v klinických testech na lidských pacientech. Tyto rozdíly mohou být zapříčiněny rozdíly v průběhu zánětlivé odpovědi při SCI u lidí a u pokusných zvířat (Stammers et al., 2012). Je tedy třeba dbát na to, aby se vybraný zvířecí model svojí patologií SCI co nejvíce podobal průběhu zranění u člověka.

Nejbližší anatomii člověka jsou modely využívající velká zvířata. Poznatky získané na modelech primátů a prasat lze mnohem snadněji převést do fáze klinického testování u lidských pacientů. Nevýhodu těchto modelů je jejich velká logistická náročnost a cena (Kwon et al., 2015). Nejčastěji využívanými zvířaty při výzkumu SCI jsou malí hlodavci, především potkani. Tyto modely jsou schopny velice uspokojivě simulovat patofyziologické, funkční i morfologické procesy SCI lidského typu. Potkaní modely umí v porovnání s myšmi lépe napodobit patologii lidského SCI, ale myší modely jsou také často využívány pro snadnou dostupnost mutagenních a transgenních kmenů. Ty mohou být využity pro zkoumání mechanismů SCI na buněčné a molekulární úrovni (Kjell & Olson, 2016). Zvířecí modely se také rozlišují podle modelu poranění. Jsou to transekční, kontusivní a kompresní modely (Cheriyen et al., 2014).

2.1.5. Experimentální a terapeutické postupy v léčbě SCI

Existuje mnoho léčebných přístupů a terapií pro léčbu následků SCI. Jedná se například o neuroprotektivní terapie, jako jsou chirurgická dekomprese a úprava krevního tlaku. Přetrvávající mechanická komprese míchy po SCI může vést k narušení toku krve, s tím související ischemii a dále i rozšíření oblasti zasažené neurálním poraněním. Aby se zamezilo expanzi poškozené tkáně, provádí se po úrazu chirurgický dekompresní zákrok, neboli raná chirurgická dekomprese. Jedná se o nejlepší možnou dostupnou klinickou léčbu po primárním poranění. Při traumatickém SCI je raná chirurgická dekomprese důležitá pro prevenci sekundárního poškození. Zákrok se provádí v časovém rozpětí 8 až 24 hodin po poranění v kombinaci se zafixováním páteře (Batchelor et al., 2013; Fehlings, Vaccaro, Wilson, et al., 2012; Wilson et al., 2017). Zmíněná úprava krevního tlaku je poměrně dobře proveditelný způsob, jak ochránit ohroženou neurální tkáň, a to prostřednictvím zvýšení perfuse (Ahuja et al., 2016; Wilson et al., 2013).

Další možností terapie SCI je podávání léčiv. Syntetický glukokortikoid methylprednison má neuroprotektivní účinky, zvyšuje uvolňování protizánětlivých cytokinů a snižuje oxidativní stres. U této látky byl v preklinických modelech traumatického SCI zaznamenán podpůrný účinek na přežití neurálních buněk (Bracken, 2012). Je také mnoho farmakologických terapií. Riluzol je benzothiazolový blokátor sodných kanálů, který svým účinkem blokuje příliv sodíkových iontů do poraněných neuronů. Takto chrání proti excitotoxické buněčné smrti, snižuje ztrátu neuronů a velikost cystické kavity. Zlepšuje senzomotorické funkce (Azbill et al., 2000; Simard et al., 2012). Z dalších látek lze uvést růstový faktor fibroblastů (FGF) (Y. Zhou et al., 2018), bakteriostatické antibiotikum minocyklin s protizánětlivými a neurotektivními účinky (Festoff et al., 2006), nebo hořčík v kombinaci s polyethylenglykolem (Kwon et al., 2009). Z přírodních látek lze zmínit epigallokatechin-3-gallát, u kterého byly prokázány neuroprotektivní účinky a podpora neuroregenerace. V experimentálních myších modelech SCI byl pozorován jeho vliv na hladiny zánětlivých cytokinů, aktivaci NF- κ B dráhy a remodelaci gliové jizvy (Machova Urdzikova et al., 2017). Využívá se také rapamycin (X. G. Li et al., 2019) nebo kurkumin. Ten tlumil zánětlivou odpověď snížením hladin mediátorů TLR4/NF- κ B zánětlivé signální dráhy u potkanů (Ni et al., 2015). Má inhibiční vliv na signální dráhu mechanického cíle rapamycinu (mTOR) a bylo popsáno, že zabraňuje tvorbě gliové jizvy po SCI (J. Lin et al., 2017).

Mnoho studií se zabývá lokálním podáním terapeutických agens pro regulaci cytokinů a podpořením regeneračních procesů po SCI, ovšem některé látky mohou mít problém s překonáním BSCB bariéry. Je ale známo několik způsobů, jak se léčivá agens mohou přes tuto bariéru dostat do místa poranění (Kabu et al., 2015; Ren et al., 2018). Využívají se například neutralizační protilátky proti ligandu. Blokace chemokinového ligandu CCL20 podporuje funkční zotavení, snižuje zánět a hladiny prozánětlivých cytokinů. Také napomáhá obnově motorických funkcí (Hu et al., 2016). Existují i nefarmakologické terapie SCI. Patří mezi ně terapeutická hypotermie (Kwon et al., 2008) nebo odstátí mozkomíšního moku. Cílem této léčebné strategie je prostřednictvím snížením tlaku předejít hypoperfusi míchy v kritickém období po zranění (Martirosyan et al., 2015).

Buněčné terapie SCI využívají nejrozličnější typy buněk, včetně kmenových. Schwannovy buňky se nacházejí v periferním nervovém systému. Jejich fyziologickou funkcí je podpora přenosu vzruchu a regenerace na periferiích. Po jejich transplantaci

byla ve zvířecích modelech pozorována remyelinizace axonů, zmenšení cystické kavity a podpora regenerace (Williams and Bunge, 2012). Mesenchymální kmenové buňky (MSC) jsou využívány pro svoji schopnost modulace zánětu jak na lokální, tak na systémové úrovni (Quertainmont et al., 2012). Lze je využívat v kombinaci s biomateriály jako jsou hydrogely (Ruzicka et al., 2019) a dalšími nosiči (Cofano et al., 2019). Neurální kmenové/prekurzové buňky (NSC/NPC) jsou schopny se diferencovat do mnoha buněčných typů CNS. Dávají vzniknout neuronům, oligodendrocytům a astrocytům. Transplantace NSC odvozených od indukovaných pluripotentních buněk podporuje funkční zotavení po SCI podporou remyelinizace (Salewski et al., 2015). NSC mají vliv na aktivaci makrofágů a snižují hladiny mRNA zánětlivých cytokinů (Cheng et al., 2016).

Regenerace SCI je omezena přítomností cystické kavity. Je snaha využít biomateriály a přemstit jimi cystickou kavitu (Mothe et al., 2013). Mnoho z těchto biomateriálů je biodegradujících nebo umí uvolnit růstové faktory. Také mohou být využity jako nosiče kmenových buněk (viz výše). Touto kombinací lze podpořit engraftmentaci (Ahuja, Nori, et al., 2017). Velkým problémem je samozřejmě také přítomnost gliové jizvy. Glykolytický enzym chondroitináza ABC byl použit *in vivo* k odstranění glykosaminoglykanových řetězců z CSPGs, čímž podpořil plasticitu a regeneraci neuronů po SCI (Burnside a Bradbury, 2014).

Existují způsoby pro podporu regenerace neuronů a i jejich tvorbu. V rámci míšního poranění je možné pomocí transkripčního faktoru Sox2 přeměnit rezidentní astrocyty na doublecortin pozitivní neuroblasty. Takto indukované neuroblasty jsou *in vivo* schopny vyžrát do neuronů tvořících synapse. Zrání neuronů je podpořeno dále kyselinou valproovou (VPA). Tato kyselina účinkuje jako inhibitor histon deacetylázy (Su et al., 2014). Adenosin trifosfát podporuje lokomotorické zotavení po SCI a jím zprostředkovaná aktivace Akt/mTOR/STAT3 dráhy podporuje endogenní neurální kmenové buňky. Indukuje neurogenezi a růst axonů. U potkanů byl pozorován jeho inhibiční účinek na astrogliózu (Sun et al., 2013).

Další možná léčba SCI je modulace autofagie (L. Zhang et al., 2014). Narušení tohoto buněčného děje v průběhu SCI přispívá k rozvoji patologie sekundárního poranění a smrti neuronů (S. Liu et al., 2015). Samotná autofagie je adaptivní proces, jehož hlavní funkcí je poskytnout buňce živiny, které jsou nezbytné pro životně důležité buněčné funkce

při různých formách buněčného stresu. Má důležitou roli i v dalších buněčných procesech a podílí se na udržování homeostázy. Proces autofagie je poměrně selektivní. Zprostředkovává na lysozomu závislou degradaci cytoplazmatických organel, proteinů a proteinových agregátů. Při degradaci materiálu dochází nejprve k tvorbě autofagozomů, které pak fúzí s lysozomy. Díky tomu může dojít k degradaci jejich obsahu lysozomálními hydrolázami. Tento kompletní proces zpracování autofagozomu se nazývá tok autofagie. Je nezbytný pro homeostázu všech buněk organismu, především pak terminálně diferencovaných, jako jsou například neurony (T. Hara et al., 2006). Modulace autofagické dráhy a její aktivity má terapeutické využití, protože její narušení hraje důležitou roli v mnoha patologiích. Mezi tyto patologie se řadí i závažná neurodegenerativní onemocnění, jako jsou například Alzheimerova, Huntingtonova nebo Parkinsonova choroba. Autofagie má neuroprotektivní funkci, a narušení jejího toku při těchto onemocněních vede ke smrti neurálních buněk (Dikic & Elazar, 2018; Klionsky & Emr, 2000; Mizushima et al., 2008; Mizushima & Komatsu, 2011; Z. Yang & Klionsky, 2010). Neuroprotektivní účinky autofagie se uplatňují i v rámci SCI a její narušení přispívá ke ztrátě neuronů. Po míšním poranění dochází ke zvýšení hladin markerů autofagie. Tento nárůst je zapříčiněn akumulací autofagozomů po SCI. Důvodem této akumulace ovšem není samotná autofagie, ale inhibice jejího toku. Ta má za následek narušení funkce lysozomů a procesu degradace autofagozomů po SCI. V důsledku toho může dojít ke zhoršení stresu v endoplazmatickém retikulu a k další smrti neuronů. (S. Liu et al., 2015; K. Zhou et al., 2017).

2.2. mTOR

2.2.1. Charakteristika a struktura mTOR

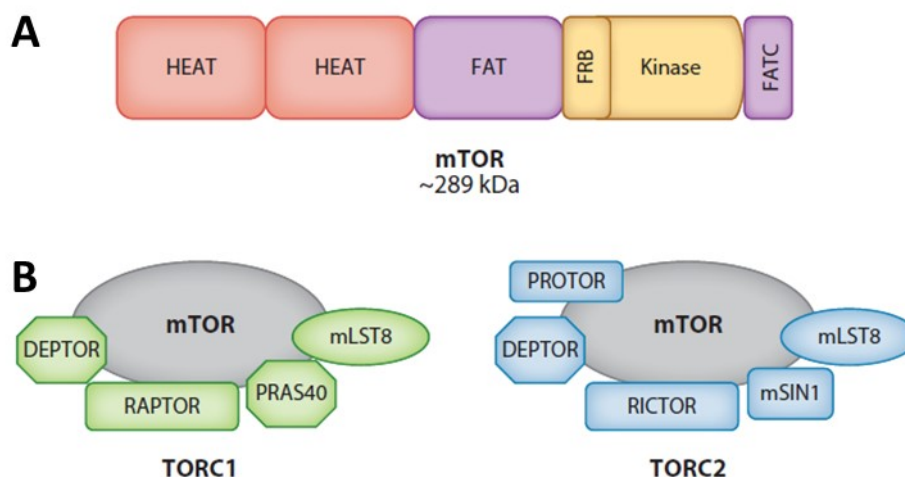
mTOR, také známý jako FKBP12-rapamycin asociovaný protein (FRAP) nebo rapamycin a FKBP12 asociovaný protein (RAFT), je evolučně konzervovaná serin/threoninová kináza s rozmanitými funkcemi v organismu. Eukaryotický TOR má molekulovou hmotnost zhruba 289 kDa a patří do rodiny kináz příbuzných fosfatidylinositol-3-kináze (PI3K). mTOR řídí buněčný růst a metabolismus pozitivní nebo negativní regulací mnoha katabolických a anabolických procesů. Děje se tak v odpověď na přítomnost živin, růstových faktorů a buněčné energie ve formě ATP. Integruje environmentální podněty, které jsou důležité pro regulaci růstu a homeostázu.

Právě díky mTOR bylo zjištěno, že buněčný růst není spontánní, ale plastický, přísně regulovaný proces, který je řízen mTOR signálními drahami (Laplante & Sabatini, 2012; Schmelzle & Hall, 2000; Zoncu et al., 2011). Podílí se i na dalších procesech v buňce, jako jsou syntéza proteinů (X. Wang & Proud, 2006) a autofagie (Rabanal-Ruiz et al., 2017). Také hraje roli v buněčném stárnutí. U experimentálních zvířat bylo pozorováno, že inhibice mTOR prodloužila jejich život a pomáhala předcházet nástupu chorob souvisejících s věkem, jako jsou rakovina nebo Alzheimerova choroba. Mechanismy tohoto procesu a jeho inhibice nebyly dosud uspokojivě objasněny (Kennedy & Lamming, 2016; Papadopoli et al., 2019; Weichhart, 2018).

Expres mTOR je konstitutivní a její regulace se ve většině případů odehrává post-translačně. U savců je mTOR kódován jako produkt jednoho genu a jeho struktura se skládá z několika domén (obr. 2A). N-konec obsahuje HEAT repetice, které se podílí na protein-proteinové interakci. Následuje fokální adhezivní doména (FAT) a rapamycin vázající doména FKB12 (FRB). V jejím těsném sousedství se pak nachází kinázová doména, která je zodpovědná za enzymovou aktivitu mTOR. Do tohoto místa se váží mTOR specifické inhibitory. C-konec obsahuje FAT doménu (FATC), která je důležitá pro udržování strukturní integrity (Laplante & Sabatini, 2009; Powell et al., 2012; H. Yang et al., 2013).

Katalytická podjednotka mTOR je součástí dvou multiproteinových komplexů (obr. 2B). Ty se odlišují svojí strukturou, funkcemi a především citlivostí k inhibici rapamycinem. mTOR komplex 1 (mTORC1) je citlivý k inhibici rapamycinem, zatímco mTOR komplex 2 (mTORC2) vůči rapamycinu citlivý není. Oba komplexy mají kromě mTOR i další podjednotky. Klíčové komponenty komplexu mTORC1 jsou mTOR katalytická podjednotka, RAPTOR (z anglického regulatory-associated protein of mTOR) a mLST8 (z anglického mammalian lethal with Sec13 protein 8). Ten je také známý jako GβL (z anglického G beta protein subunit-like) (Jacinto et al., 2004). RAPTOR interaguje se signálním motivem TOR (TOS), čímž pomáhá zprostředkovat vazbu mTORC1 a jeho substrátu. Je zásadní pro správnou subcelulární lokalizaci mTORC1 (K. Hara et al., 2002; D. H. Kim et al., 2002; Nojima et al., 2003). mLST8 se váže na katalytickou mTOR podjednotku a umí stabilizovat aktivační smyčku mTOR kinázy (H. Yang et al., 2013). Kromě těchto tří podjednotek má mTORC1 ještě dvě inhibiční podjednotky. Ty se nazývají PRAS40 (z anglického proline-rich Akt substrate

of 40 kDa) (Sancak et al., 2007; L. Wang et al., 2007) a DEPTOR (z anglického DEP domain containing mTOR interacting protein) (Peterson et al., 2009). Při inhibici rapamycinem a jeho analogy dochází k jejich navázání na FKBP12 doménu, čímž se zabrání navázání RAPTORu na mTOR. Tím je znemožněno vytvoření mTORC1 komplexu (Abraham & Wiederrecht, 1996). Součástí obou mTOR komplexů je proteinová podjednotka Tti1/Tel2 (Kaizuka et al., 2010).



Obrázek 2: Struktura mTOR domény (A) a struktura mTOR komplexů (B). (A) Zleva (N-konec) HEAT repetice (červeně), fokální adhezivní doména (FAT) (fialově), rapamycin vázající doména FKBP12 (FRB) a doména zodpovídající za kinázovou aktivitu mTOR (žlutě), C-koncová FAT doména (FATC) (fialově). mTORC komplexy mají několik podjednotek (B). Oba mají mTOR katalytickou podjednotku, DEPTOR (z anglického DEP domain containing mTOR interacting protein) a mLST8 (z anglického mammalian lethal with Sec13 protein 8). RAPTOR (z anglického regulatory-associated protein of mTOR) a PRAS40 (z anglického proline-rich Akt substrate of 40 kDa) má pouze mTORC1. Podjednotky mSIN1 (z anglického mammalian stress-activated protein kinase [SAPK]-interacting protein), PROTOR (z anglického protein observed with RICTOR) a RICTOR (z anglického rapamycin insensitive companion of mTOR) jsou u mTORC2. Převzato a upraveno z Powell et al., 2012.

Stejně jako mTORC1 má i mTORC2 katalytickou podjednotku mTOR, DEPTOR a mLST8. Namísto RAPTORu má ale protein RICTOR (z anglického rapamycin insensitive companion of mTOR) (Dos et al., 2004; Jacinto et al., 2004). Součástí mTORC2 jsou také regulační podjednotky mSIN1 (z anglického mammalian stress-activated protein kinase [SAPK]-interacting protein) (Frias et al., 2006) a PROTOR 1/2 (z anglického protein observed with RICTOR1/2) (Pearce et al., 2007). Na rozdíl od mTORC1 není mTORC2 citlivý k inhibici rapamycinem. Při dlouhodobé inhibici a u určitých buněčných typů byl u mTORC2 pozorován komplexnější efekt (Haissaguerre

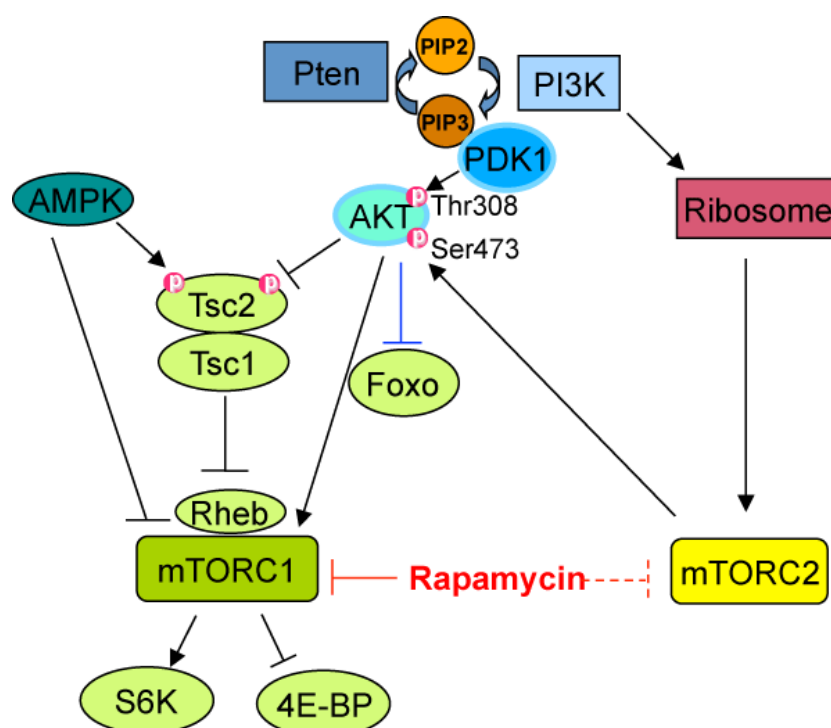
et al., 2014; Sarbassov et al., 2006). Došlo k narušení mTORC2 signalizace, a to zřejmě v důsledku vazby rapamycinu na volný mTOR. Tento mTOR pak nebylo možné inkorporovat do nově vznikajících mTORC2 komplexů (Lamming et al., 2012; Saxton & Sabatini, 2017). Alosterický inhibitor rapamycin a jeho analogy nejsou jediné mTOR inhibitory. Některé látky jsou schopny inhibovat jak mTORC1, tak mTORC2. Například ATP-kompetitivní inhibitor PP242 je schopen kombinované inhibice mTORC1 a mTORC2. Toho lze využít při léčbě glioblastomu. Inhibice zprostředkovaná PP242 potlačuje růst a šíření tohoto typu nádoru mnohem efektivněji než alostericky se vážající inhibitory mTOR (Neil et al., 2016). Podobně slibné tlumivé účinky na neuroinflamaci byly pozorovány u duálního inhibitoru KU0063794 (Cordaro et al., 2017).

2.2.2. Signální dráha mTOR

Oba komplexy mTOR jsou součástí klíčové intracelulární signální dráhy PI3K/Akt/mTOR (obr. 3). Signalizační děje v buňce, ve kterých hraje mTOR roli, lze rozdělit do dvou směrů podle toho, od kterého ze dvou mTOR komplexů se signalizace odvíjí (obr. 4). mTORC1 řídí růst buňky z hlediska času, má vliv na její velikost a také na to, kdy bude buňka růst. mTORC2 diriguje buněčný růst z hlediska prostoru, tedy kde bude buňka růst. Jeho signální dráhy mají vliv na cytoskelet. Díky tomu určují, jaký bude mít buňka tvar. Oba komplexy reagují na přítomnost nejrozličnějších signálů. Mezi ty patří již zmíněné růstové faktory, dostatek energie a buněčný stres. V reakci na tyto signály je pak odpovídajícím způsobem regulován buněčný růst (Huang & Fingar, 2014; Loewith et al., 2002; Wullschleger et al., 2006). Pokud se v regulaci mTOR dráhy objeví abnormality, mohou vést ke vzniku patologií. Toto platí i obráceně, kdy k aktivaci dráhy dochází při patologiích, jako je například poranění míchy (Saxton and Sabatini, 2017).

Samotná odpověď mTOR na růstové faktory probíhá přes PI3K dráhu (obr. 3). Insulin nebo insulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) se váže na příslušné receptory. Navázání způsobí fosforylaci insulin receptorového substrátu (IRS). Do signalizace se zapojí kináza PI3K, která se naváže na IRS a katalyzuje přeměnu fosfatidylinositol-4,5-fosfátu (PIP2), který je přítomen v buněčné membráně, na fosfatidylinositol-3,4,5-fosfát (PIP3). Lipidová fosfatáza PTEN (z anglického phosphatase and tensin homolog) hlídá, aby nedošlo k jeho akumulaci. PIP3 dále rekrutuje protein 3-fosfoinositid dependentní proteinkinázu 1 (PDK1) a proteinkinázu B (neboli Akt) do membrány. To vede

k fosforylaci a tedy i k aktivaci Akt prostřednictvím PDK1. mTOR je na PI3K dráhu napojen prostřednictvím proteinů tuberózní sklerózy (TSC). Jedná se o heterodimerní komplex, který je tvořen proteiny TSC1 (hamartin), TSC2 (tuberin), a TBC1D7. Mnoho upstream (doslova „proti proudu“ signalizace) faktorů a signálů se sbíhá právě na TSC1/2 heterodimeru. Přes něj jsou dále schopny řídit mTOR signalizaci. Například růstové faktory ovlivňují mTORC1 právě inhibicí TSC1/2 komplexu (Dibble et al., 2012; Manning, 2004; Wullschleger et al., 2006). TSC1/2 komplex slouží jako GTPázu aktivující protein (GAP) pro Rheb (z anglického Ras homolog enriched in brain). Tato GTPáza se poté váže na mTORC1 a tím ho aktivuje (Inoki et al., 2003).



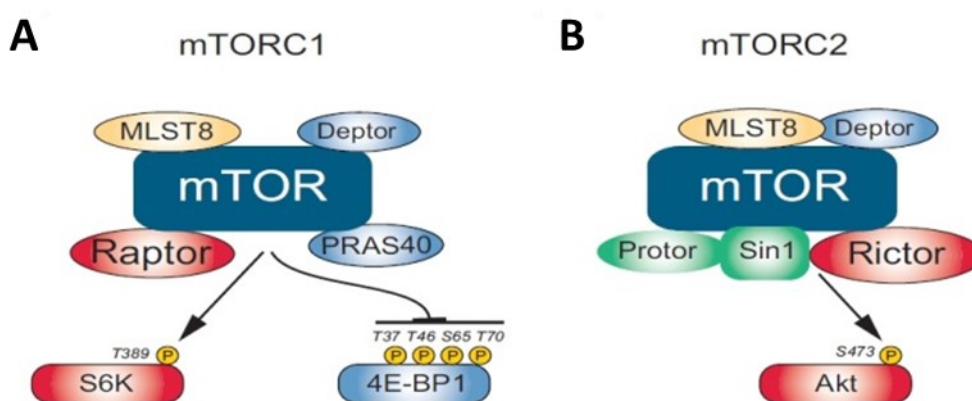
Obrázek 3: PI3K/Akt/mTOR signální dráha. mTOR kináza je součástí dráhy PI3K/Akt/mTOR. Je pod dohledem negativních regulátorů PTEN (z anglického Phosphatase and tensin homolog) a komplexu proteinů tuberózní sklerózy (TSC1/2). GTPázou Rheb (z anglického Ras homolog enriched in brain) dochází k integraci podnětů pro aktivaci mTORC1 signalizace. AMP-aktivovaná proteinkináza (AMPK) podporuje aktivitu TSC1/2. Vazebný protein 1 eukaryotického faktoru iniciace translace 4 (4E-BP1) a S6 kinázy (S6K) jsou cíle fosforylační aktivity komplexu mTORC1. mTORC2 komplex aktivuje kinázu Akt, která fosforyluje proteiny Fox (z anglického forkhead box) třídy O (Foxo). Existuje také na ribozomu závislá signalizace mezi PI3K a mTORC2. Převzato a upraveno z Wang & Chi, 2014.

Aktivace mTORC1 vede k translaci proteinů. Děje se tak prostřednictvím fosforylace dvou jeho dvou efektorových proteinů, vazebného proteinu 1 eukaryotického faktoru

iniciace translace 4 (4E-BP1) a ribosomálních proteinkináz S6 (S6K) (obr. 4A). S6K jsou fosforylovány na threoninu 389 (Alessi et al., 1998), čímž je umožněna následná fosforylace a aktivace PDK1 kinázy. S6K fosforyluje faktory, které podporují iniciaci mRNA translace (Holz et al., 2005). 4E-BP1 je postupně fosforylován na čtyřech místech. Jako první jsou fosforylovány threoniny 37, 46 a 70, a poté serin 65 (Gingras et al., 2001). Díky mTORC1 zprostředkované fosforylaci dojde k uvolnění 4E-BP1 od jeho vazebného partnera, eukaryotického iniciačního faktoru translace 4E (eIF4E). Vazba 4E-BP1 na eIF4E inhibuje tvorbu 5' translačního iniciačního komplexu. Po fosforylaci 4E-BP1 dochází k jeho disociaci od eIF4E, čímž je umožněna tvorba preiniciačního komplexu a iniciace translace mRNA (Brunn et al., 1997; Haar et al., 2007; X. M. Ma & Blenis, 2009). Další děje pod vlivem mTORC1 signalizace, které jsou klíčové pro buněčný růst, jsou procesy glykolýzy a *de novo* syntéza lipidů (Düvel et al., 2010). mTORC1 má také pozitivní vliv na syntézu nukleotidů pro DNA replikaci a tvorbu ribozomů (Ben-Sahra et al., 2016) a podílí se na regulaci metabolického obratu proteinů (J. Kim et al., 2011). Na metabolismu aminokyselin lze demonstrovat vliv živin na mTORC1 signalizaci. Konkrétním příkladem je absence aminokyseliny leucinu. Její nedostatek vede k defosforylaci efektorů mTORC1, S6K1 a 4E-BP1. Pokud je leucinu dostatek, signalizace se vrátí do normálu a fosforylace efektorů je obnovena (Wullschleger et al., 2006). mTORC1 je také schopen detekovat hladinu energie v buňce pomocí AMP-aktivované proteinkinázy (AMPK). Tato kináza je aktivována v odpověď na nízkou hladinu energie v buňce, tlumí energeticky náročné procesy a podporuje syntézu ATP (Hay & Sonenberg, 2004). mTORC1 zprostředkovává odpověď na stres, který může být intra- nebo extracelulárního původu. Buněčná odpověď na stres z prostředí spočívá především v utlumení energeticky náročných procesů a zastavení růstu. Stresem je pro buňky například hypoxie, při které je inhibována mTORC1 signalizace a dochází ke snížení proteosyntézy, nebo poškození DNA. To vede k aktivaci proteinu p53, který je schopen inhibovat aktivitu mTOR přes AMPK-TSC2 signální dráhu (Feng et al., 2005).

Signalizační kaskáda mTORC2 je poněkud komplikovanější, než je tomu u mTORC1 (obr. 4B). PDK1 fosforyluje Akt na threoninu 308, čímž dochází ke zvýšení aktivity této proteinkinázy. Akt potom fosforyluje podjednotku mTORC2 mSIN1 na tyrosinu 86. Díky tomu dojde ke zvýšení kinázové aktivity mTORC2, což umožní fosforylaci Akt na serinu 473 a plnou aktivaci Akt (G. Yang et al., 2015). mTORC2 signalizace je také

regulována přes mTORC1 díky přítomnosti negativní zpětné vazby mezi mTORC1 a PI3K insulinovou signalizací. Tato zpětnovazebná regulace mTORC2 a PI3K signalizace přes mTORC1 je potenciální cíl pro farmakologii (Saxton & Sabatini, 2017). Signální dráhy mTORC2 mají vliv na proliferaci a přežití buněk. Tyto děje jsou zprostředkovány fosforylací proteinkináz rodiny AGC (PKA/PKG/PKC), mezi které patří i regulátor organizace aktinového cytoskeletu proteinkináza C alfa (PKC α) (Dos et al., 2004). Nejdůležitějším cílem mTORC2 fosforylace je zcela jistě Akt, klíčový regulátor buněčného přežití a efektor v PI3K signalizaci. (Sarbasov et al., 2005). Mezi mTORC2 a PI3K existuje na ribozomu závislá signalizace (obr. 3) (Zinzalla et al., 2011).



Obrázek 4: mTOR komplexy a cíle jejich kinázové aktivity. Aktivovaný mTORC1 (A) fosforyluje vazebný protein 1 eukaryotického faktoru iniciace translace 4 (eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1) a ribosomální proteinkinázy S6K. Kinázy S6 jsou fosforylovány na threoninu 389, 4E-BP1 na threoninech 37, 46 a 70, a na serinu 65. mTORC2 (B) fosforyluje kinázu Akt na serinu 473. Převzato a upraveno z Tchekina & Komelkov, 2012.

Kromě řízení buněčného růstu a dějů s ní spojených hraje mTOR dráha roli v dalších důležitých buněčných procesech. V populacích kmenových buněk je dráha důležitá pro signalizaci, diferenciaci a proliferaci (Meng et al., 2018). U neurálních kmenových buněk byla prokázána regulační role dráhy ve vývoji mozku (Licusi & Hartman, 2018) a v neurologických procesech. Nezbytnost mTOR signalizace pro mozek lze ukázat na mnoha patologiích, u kterých je tato dráha narušena. Patří mezi ně autismus, epilepsie (Lipton & Sahin, 2014) a neurodegenerativní onemocnění. Lze uvést například amyotrofickou laterální sklerózu, Alzheimerovu nebo Huntingtonovu chorobu. Při těchto neurodegenerativních onemocněních dochází k permanentní ztrátě neurální struktury a funkce, a to především z důvodu ukládání toxických proteinových agregátů. Ty jsou

tvořeny špatně sbalenými proteiny, které neurony nejsou schopny eliminovat. Ukládání agregátů způsobuje poškození buněk a dokonce i jejich smrt. Terapeutický přístup využívající cílenou inhibici aktivity mTOR může snížit míru neurodegenerace spojenou s těmito chorobami (Laplane & Sabatini, 2012; T. Ma et al., 2010; Ravikumar et al., 2004; Spilman et al., 2011). Dále je mTOR signalizace nezbytná pro imunitu, kde slouží jako důležitý spojovací článek mezi funkcemi imunitních buněk a metabolismem. Také s její pomocí dochází k integraci a zpracování podnětů z imunitního mikroprostředí. Na základě toho je ovlivněna diferenciaci a maturace antigen prezentujících buněk a lymfocytů. mTOR hraje roli v rozpoznávání antigenu a podílí se na směřování a cílení adaptivní imunitní odpovědi. Dráha má také vliv i na regulaci žírných a dendritických buněk, neutrofilů a $\gamma\delta$ T lymfocytů (Powell et al., 2012).

Mnoho molekul PI3K signální kaskády podléhá mutacím při nádorovém bujení. Často dochází ke ztrátě funkce proteinu p53, což mimo jiné vede k aktivaci mTORC1 (Feng et al., 2005). Některé rakoviny se rozvinou z mutací v genech pro TSC1/2 nebo PTEN. Abnormality v regulaci proteinové syntézy na úrovni 4E-BP1/eIF4E přispívají k tvorbě tumorů. Na druhou stranu, příspěvek S6K1 k rakovinotvorným procesům je zřejmě velice omezený. Z toho vyplývá, že tyto dva významné proteiny mTORC1 signalizace nejsou do rakovinotvorných procesů zapojeny stejným dílem (Hsieh et al., 2010). Přesné mechanismy přispívání osy mTORC1/4E-BP1/eIF4E nejsou zcela známy (Laplane & Sabatini, 2012).

2.2.3. Rapamycin

Jak bylo do detailu popsáno výše, mTOR je klíčový v mnoha buněčných a patologických dějích. To z něj dělá zajímavý cíl terapeutického zásahu a předmět mnoha klinických studií. Jsou známy různé inhibitory mTOR signalizace. Nejznámějším z těchto inhibitorů je rapamycin. Tato látka byla popsána ještě před samotnou kinázou, které dala jméno. Rapamycin, klinickým názvem sirolimus, byl objeven v roce 1964 na ostrově Rapa Nui. Jedná se o látku produkovanou v půdě žijícími bakteriemi, která má antifungální, imunosupresivní, a protinádorové vlastnosti (Sehgal et al., 1975). Bylo zjištěno, že rapamycin vytváří funkční komplex s peptidyl-prolyl izomerázou FKB12. Takto je schopen inhibovat přenos signálu u drah, které jsou nezbytné pro buněčný růst a proliferaci (Chung et al., 1992). Přesný mechanismus působení rapamycinu byl ale

objasněn až s objevením mTOR kinázy, cílem jeho působení (Sabatini et al., 1994). Rapamycin a jeho analogy, neboli rapalogy, se využívají jako terapeutická agens při transplantaci, diabetu a léčbě různých poruch a onemocnění. Mezi ty patří rakovina a neurodegenerativní onemocnění (Erllich et al., 2007). V léčbě rakoviny se využívá rapamycin a jeho analogy, například temsirolimus pro léčbu renálních nádorů. Dalším příkladem je everolimus, který je schválený pro léčbu tuberózní sklerózy. Jedná se o poměrně vzácnou genetickou poruchu způsobenou mutací v Tsc1/2. Dochází při ní k tvorbě nemaligních tumorů v mnoha orgánech včetně mozku (Wander et al., 2011).

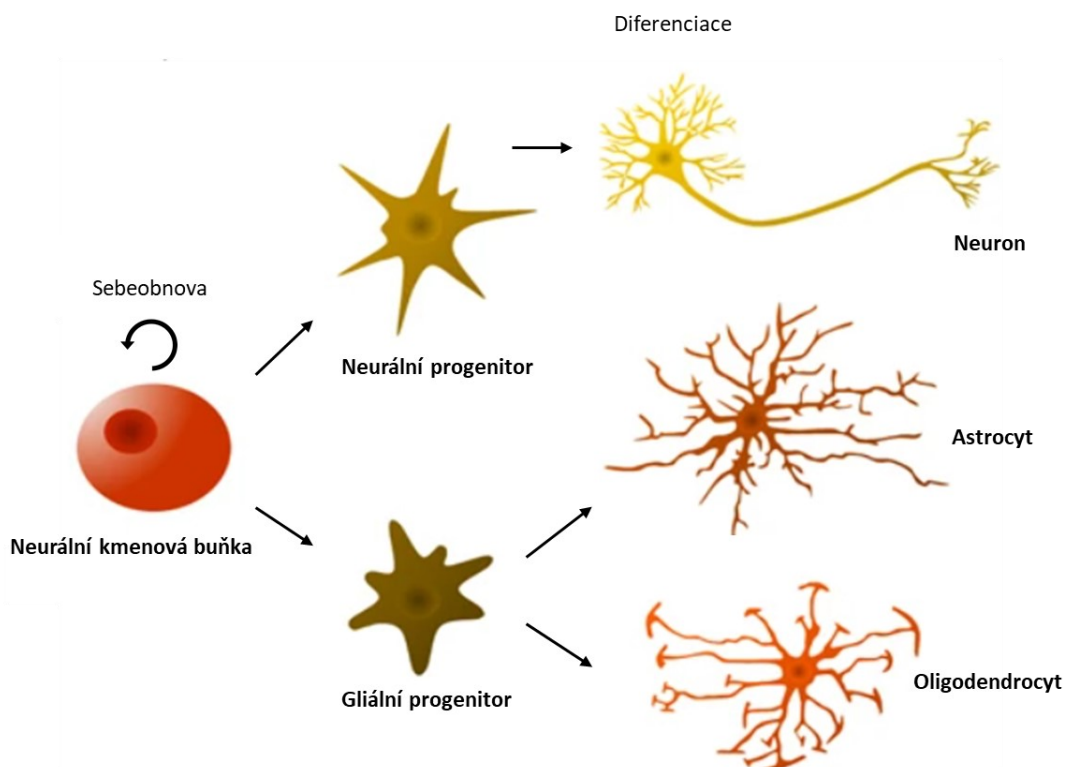
Inhibice mTOR dráhy snižuje míru poškození nervové tkáně při poraněních CNS, včetně poranění míchy. Podání rapamycinu výrazným způsobem snižuje fosforylaci S6K a zvyšuje hladiny exprese proteinů LC3 (z anglického light chain 3) a Beclinu 1, markerů autofagie, ve zraněné míše. Dochází ke zvýšení exprese fosforylované formy Akt. Z těchto poznatků vyplývá, že podání rapamycinu má neuroprotektivní efekt. Podporuje Akt signalizaci a zvyšuje autofagii inhibicí mTOR signální dráhy po SCI. Inhibice mTOR také výrazně snižuje ztrátu neuronů a smrt buněk v poraněné míše (Erllich et al., 2007; Kanno et al., 2012; X. G. Li et al., 2019; L. Zhang et al., 2014).

2.3. Neurální kmenové buňky

2.3.1. Charakterizace a vlastnosti NSC

Neurální kmenové buňky jsou multipotentní buňky, charakteristické svojí schopností sebeobnovy, proliferace a diferenciaci. Diferenciací mohou dát vzniknout buňkám neurální řady (obr. 5). Patří mezi ně neurony, oligodendrocyty a astrocyty. Další jejich vlastností je zůstat po dlouhou dobu v klidovém stavu, a poskytnout tak rezervoár pro nahrazování buněk a regeneraci během života (Andreotti et al., 2019; Reynolds & Weiss, 1992). Při procesech diferenciaci (obr. 5) z NSC nejprve vznikají neurální a gliální progenitory. Neurální progenitor dává další diferenciací vzniknout neuronům, gliální progenitor astrocytům a oligodendrocytům. K diferenciaci dochází především v průběhu embryonálního vývoje, postnatálně dominuje gliogeneze. V dospělosti neurogeneze přetrvává v subventrikulární zóně (SVZ) a v subgranulární zóně (SGZ) hipokampu (Beattie & Hippenmeyer, 2017; Ihrie & Alvarez-Buylla, 2008). Osud NSC při diferenciaci závisí na přítomných morfogenech, růstových a transkripčních faktorech.

Roli hrají i okolní buňky a extracelulární matrix. Jedná se o komplexní souhru procesů od epigenetické po translační úroveň (Vieira et al., 2018; Yao et al., 2012).



Obrázek 5: Diferenciace neurálních kmenových buněk do různých typů buněk neurální řady. Neurální kmenová buňka se diferenciuje do různých typů buněk neurální linie. Její populace se udržuje dělením. Při procesu diferenciace vznikají nejprve progenitory a z nich potom terminálně diferencované buňky. Neurální progenitor dává vzniknout neuronům, gliální progenitor astrocytům a oligodendrocytům. Převzato a upraveno z Tang et al., 2017.

Buňky CNS s kmenovými vlastnostmi lze nalézt v těle i jinde než jen v mozku. Ependymální kmenové/progenitorové buňky (epSPC) jsou dospělé multipotentní kmenové buňky. Spolu s astrocyty a progenitory oligodendrocytů (OPC) jsou nejdůležitějšími dělicími se buňkami dospělé CNS. Zatímco astrocyty a OPC jsou schopny pouze sebeobnovy a nelze je tak považovat za kmenové buňky, ependymální buňky mají multipotenci zachovalou. Nacházejí se v míšním kanálu a mohou dát vzniknout gliím a neuronům. Experimentálně bylo zjištěno, že při transplantaci do zvířecího modelu SCI vykazují epSPC dobré výsledky. Byly schopné dlouhodobého přežití, podporovaly zlepšení motorické aktivity a tumorogeneze byla pozorována jen v malé míře (Gazdic et al., 2018; Moreno-Manzano et al., 2009; Ronaghi et al., 2010).

Existují různé zdroje NSC, například embryonální buňky, indukované pluripotentní buňky a z nich odvozené neurální progenitory, nebo přeprogramované astrocyty. Indukované pluripotentní buňky jsou hojně využívány pro studium neurodegenerativních a neurovývojových poruch, a to především díky své schopnosti vytvářet definované populace neuronů (Grochowski et al., 2018).

2.3.2. mTOR a jeho signální dráha v NSC

Proces, během kterého se z NSC stane plně diferencovaný a správně fungující neuron, je poměrně komplikovaný. Vyžaduje regulaci prostřednictvím vnějších i vnitřních signálů. Mnoho zúčastněných extracelulárních signálů se sbíhá v mTOR dráze. mTOR a jeho komplexy mají vliv na mnoho procesů neurogeneze. Patří mezi ně diferenciaci a proliferaci NSC, tvorba synapsí, migrace neurálních progenitorů, maturace různých neurálních populací a udržování sebeobnovovací schopnosti kmenových buněk. mTORC1 je klíčový pro diferenciaci NSC do dceřiných buněk. Narušení aktivity této mTOR dráhy nebo jejích signalizačních dějů během vývoje vede k defektům. Dalšími patologickými důsledky jsou vznik tumorů a neurovývojové poruchy (D. Y. Lee, 2015; Licausi & Hartman, 2018; Paliouras et al., 2012; Tee et al., 2016). Názor na roli mTOR signální dráhy v proliferaci a diferenciaci NSC ovšem není úplně jednotný. Její důležitost je nezpochybnitelná, ovšem jak přesně se PI3K/Akt/mTOR dráha na těchto dějích podílí nebylo dosud úplně uspokojivě objasněno.

Podle některých prací je mTORC1 zásadní pro proliferaci a přežití NSC. Snížení jeho aktivity mělo za následek zmenšení populace neurálních progenitorů. Inhibice mTORC1 měla také negativní vliv na počet neuronů tvořených postnatálně v SVZ. Hyperaktivace komplexu naopak vedla k akcelerované diferenciaci NSC a tím i jejich vyčerpání (Hartman et al., 2013; Switon et al., 2017). Další práce souhlasí s vlivem hyperaktivovaného mTORC1 na postupnou ztrátu NSC, a dodává že aktivace mTORC1 indukuje terminální diferenciaci NSC v neonatální SVZ, ovšem rozporuje jeho vliv na proliferaci (Mahoney et al., 2016). Bylo také popsáno, že při inhibici mTOR rapamycinem docházelo ke snížení neurální diferenciace, aniž by byla ovlivněna proliferace (J. E. Lee et al., 2016a). U insulinu byly pozorovány podpůrné účinky na neurální diferenciaci signální dráhou PI3K/Akt/mTOR. Hladina fosforylovaného mTOR byla zvýšena u PI3K-Akt závislé cesty diferenciace neurálních progenitorů, která

byla indukována insulinem (Han et al., 2008). Role mTORC1 aktivity ve stimulaci tvorby neuronů byla popsána i v dalších publikacích (Chinta & Andersen, 2005; J. E. Lee et al., 2016b). V porovnání s ostatními tkáněmi má CNS velmi malou regenerační kapacitu. Bylo prokázáno, že aktivace mTOR inaktivací PTEN nebo TSC1 může podpořit axonální regeneraci (Julien et al., 2010). Kromě role v NSC diferenciaci se mTOR podílí i na procesu tvorby dendritů, které jsou nezbytné pro správný přenos signálů mezi neurony (Skalecka et al., 2016). I přes tyto nejednotné závěry je zřejmé, že aktivita mTORC1 je důležitá pro vývoj neuronů, i když je třeba dalšího výzkumu pro identifikaci konkrétních mechanismů. Nejednotné závěry mohou být způsobeny rozdílnou metodologií prací, například použitím myších modelů nebo odvození NSC *ex vivo* spolu s transplantací (Meng et al., 2018).

Otázka je i ohledně vlivu imunosupresiv, jakými jsou cyclosporin A, rapamycin a jeho analogy, případně další terapeuticky využívaná agens. Imunosupresiva mají přímý vliv na diferenciaci a proliferaci lidských NSC *in vitro*, ale neovlivňují buněčnou migraci a proliferaci *in vivo* (Sontag et al., 2013). Z dalších látek lze zmínit VPA. Ta indukuje neurální diferenciaci u NSC, i když konkrétní mechanismy jejího účinku nejsou prozkoumané. Aktivace mTOR nejenomže podporuje, ale je dokonce nutná pro neurální diferenciaci NSC indukovaných VPA (Xi Zhang et al., 2017).

2.3.3. Terapeutické využití NSC v patologii SCI

Neurální kmenové buňky a neurální progenitory jsou díky svým vlastnostem a terapeutické plasticitě považovány za nejslibnější zdroj pro léčbu patologií nervového systému už delší dobu. Transplantované NSC podporují děje důležité pro obnovu tkáně CNS. Mají imunomodulační a neuroprotektivní účinky, podporují regeneraci a obnovu synapsí. Mohou se diferencovat a nahrazovat tak odumřelé buňky nervové tkáně (Martino et al., 2011; Pereira et al., 2019). Transplantace imortalizovaných spinálních neurálních prekursorů (SPC-01) vykazovala imunosupresivní účinky a tlumila zánětlivé procesy probíhající v poškozené míše. K tomuto docházelo inhibicí NF-κB dráhy, která se podílí na zánětlivé odpovědi při SCI (Károva et al., 2019). Intraspinální transplantace neurálních progenitorů odvozených od indukovaných pluripotentních buněk (iPSC-NPs) má příznivý účinek na zotavení, podporuje zachování šedé a bílé hmoty, růst axonálních kolaterál a snižuje astrogliózu (Amemori et al., 2015). Při léčbě míšního poranění se

kromě NSC a jejich prekurzorů uplatňují také MSC, které jsou využívány pro své imunomodulační vlastnosti a růstem na různých biomateriálech. Účinky MSC, SPC-01 a iPSC-NPs v prostředí experimentálního SCI byly detailně popsány a porovnány. Nejpriznivější vliv na patologii SCI v potkaním modelu byl z těchto tří typů buněk pozorován u iPSC-NPs (Ruzicka et al., 2017).

Kromě transplantace NSC lze také mobilizovat endogenní kmenové buňky, které jsou přítomny v dospělé míše, a tak ovlivňovat regenerační procesy probíhající v CNS. Tento postup mobilizace buněk je slibným terapeutickým přístupem pro podpoření reparačních mechanismů po SCI (Gazdic et al., 2018). Endogenní buňky je možné také transplantovat. U experimentálních zvířat, kterým byly transplantovány NSC odvozené od dospělé míchy, došlo ke zlepšení po SCI (Stenudd et al., 2015).

3. Cíle diplomové práce

- Studium role mTOR signální dráhy v proliferaci a diferenciaci neurálních kmenových buněk odvozených od indukovaných pluripotentních buněk (iPSC-NPs) *in vitro*. Pro studium mTOR dráhy jsme využili rapamycin, inhibitor jejího hlavního komplexu mTORC1. Účinek rapamycinu byl ověřen analýzou proteinů, které jsou cíle mTOR signalizace. Byly využity metody western blot a imunocytochemického barvení.
- Studium efektu podání rapamycinu na míšní poranění *in vivo*. Zaměření se na dopad inhibice mTOR signální dráhy, tok autofagie a produkci cytokinů v zasažené tkáni s využitím metod imunohistochemie, western blot a imunoassay.

4. Materiál a metody

4.1. Metody buněčného experimentu

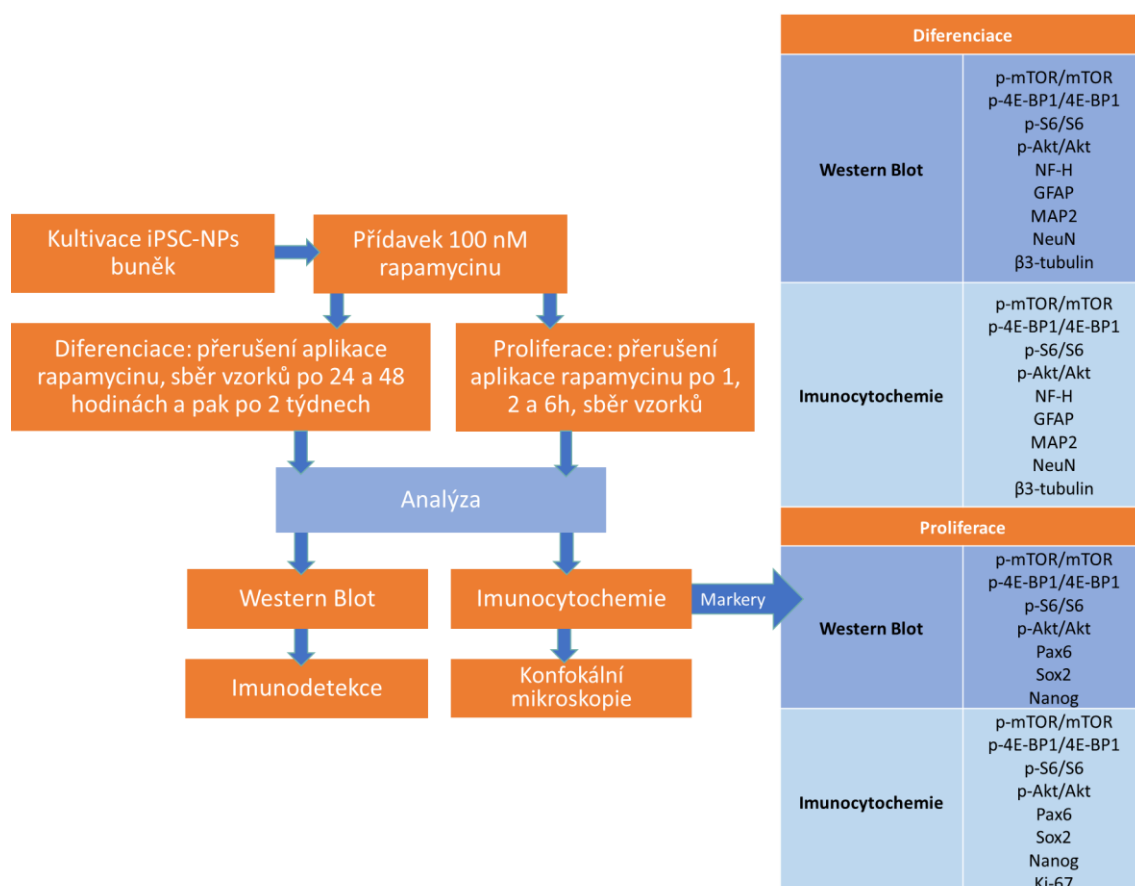


Schéma 1: Metody buněčného experimentu. Buňky byly kultivovány a poté, co narostly do dostatečné hustoty (60–80%), byly rozděleny do dvou skupin. Jedna byla využita pro zkoumání vlivu rapamycinu na diferenciaci, druhá na proliferaci. U obou skupin sloužila polovina buněk jako kontrola a druhé polovině byl přidán rapamycin (100 nM). V průběhu diferenciačního a proliferačního experimentu byla aplikace rapamycinu přerušena v popsanych intervalech a byly sbírány vzorky pro analýzu. Byly použity metody western blot v kombinaci s imunodetekcí a imunocytochemické barvení, které bylo vyhodnoceno pomocí konfokálního mikroskopu. Prostřednictvím těchto metod byly detekovány proteiny mTOR signální dráhy a markery typické pro diferenciaci a proliferaci neurálních kmenových buněk.

4.1.1. Kultivace buněk

Pro buněčný *in vitro* experiment (schéma 1) bylo potřeba nejprve vypěstovat kultury NSC. V *in vitro* experimentu byly použity neurální prekursorové diferenciované z lidských indukovaných pluripotentních buněk (iPSC-NPs) odvozených od fetálních plicních fibroblastů linie (iMR 90; ATCC, Manassas, VA, USA). Buňky byly kultivovány na podkladu potaženém poly-L-ornitinem (Sigma-Aldrich) a lamininem (Sigma-Aldrich)

v CO₂ inkubátoru (MCO-170AICUVH-PE, Panasonic) při 37°C. Použité kultivační NSC médium s růstovými faktory bylo následujícího složení: DMEM:F12 a neurobazální médium (1:1), suplementy B27 (1:50) a N2 (1:100), směs antibiotik penicilinu a streptomycinu (1:200) (vše od GIBCO), růstové faktory EGF (10 ng/ml), bFGF (10 ng/ml) a BDNF (10 ng/ml) (všechny od PeproTech), antibiotikum primocin (1:500) (InvivoGen). S takto kultivovanými buňkami byly provedeny dva typy experimentů, které měly za cíl objasnit vliv přídatku rapamycinu (Tocris Bioscience) diferenciaci a proliferaci NSC.

Poté co buňky narostly do potřebné hustoty (60–80%), byl k nim přidán rapamycin (100 nM) v NSC médiu, které neobsahovalo růstové faktory. V daných časových intervalech bylo buňkám vyměněno NSC médium s rapamycinem za diferenciační NSC médium. Jednalo se o intervaly po 24 a 48 hodinách po přídatku rapamycinu, a poté po dvou týdnech (schéma 1). Diferenciační médium obsahovalo NSC růstové médium ve složení popsaném výše, ale místo růstových faktorů k němu byla přidána kyselina retinová (50 nM) (Sigma-Aldrich) a Sonic hedgehog protein (50 ng/ml) (PeproTech). Přídatkem diferenciačního média byl zastaven účinek rapamycinu a byla spuštěna diferenciace. Po skončení diferenciace byly buňky zpracovány pro analýzu metodou western blot a pro imunocytochemické barvení. Analýzou získaných vzorků zmíněnými metodami byl zjištěn vliv rapamycinu na diferenciaci NSC.

Při proliferačním experimentu (schéma 1) byly buňky kultivovány s NSC médiem obsahujícím růstové faktory po dobu 24 hodin. Poté bylo NSC médium vyměněno za NSC médium s rapamycinem a bylo ponecháno působit po dobu 1, 2 a 6 hodin. Buňky byly poté sklizeny a zpracovány pro analýzu western blot a imunocytochemické barvení zavedeným postupem.

Jak diferenciační, tak i proliferační experiment byl celý proveden třikrát.

4.1.2. Imunocytochemie

Pro imunocytochemické barvení byly buňky nejprve zafixovány pomocí 4% paraformaldehydu (PFA) (Penta) a propláchnuty fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem PBS (GIBCO). Prvním krokem při samotném imunocytochemickém barvení byla permeabilizace membrán, aby byla možná detekce proteinů uvnitř buňky. Do každé jamky kultivační destičky byl napipetován roztok 0,2% Tritonu v PBS, následovala

inkubace ve tmě a blokace pomocí 10% roztoku NGS séra (Merck) v PBS. Po dokončení permeabilizace a blokace byly do jamek přidány primární protilátky naředěné v roztoku 2% NGS a 0,1 % Tritonu v PBS. Jednotlivé protilátky i s jejich ředěním jsou popsány v tabulce (tabulka 1). S protilátkami byly buňky inkubovány přes noc při 4°C ve tmě. Další den byly do jamek napipetovány příslušné sekundární protilátky ředěné v poměru 1:400 ve stejném roztoku, jaký byl použit pro ředění primárních protilátek. Po inkubaci se sekundárními protilátkami byl do všech jamek napipetován roztok DAPI (Invitrogen), který byl připraven v PBS ředěním 1:2500. Sklíčka s buňkami byla vyjmuta z jamek a pomocí roztoku Aqua Poly/Mount (Polysciences) připevněna na mikroskopická krycí sklíčka. Konfokálním mikroskopem (Carl Zeiss LSM 880 NLO, Carl Zeiss AG, zvětšení 400x) byly detekovány markery diferenciaci a proliferace.

Tabulka 1: Primární protilátky použité v in vitro a in vivo experimentech pro metody western blot (WB), imunocytochemii (ICC) a imunohistochemii (IHC). Pro ředění protilátek pro metodu western blot byl použit 5% roztok hovězího sérového albuminu (BSA).

Protilátka	Typ protilátky	Western blot	ICC /IHC	Molekulová hmotnost (kDa)	Výrobce	Katalogové číslo
Ki-67	králičí	x	1:400 1:800 1:1000	319, 345, 395	Abcam	ab833
mTOR	králičí	1:1000, BSA	1:400	289	Cell Signaling Technology	2983
p-mTOR	králičí	1:1000, BSA	1:50	289	Cell Signaling Technology	5536
MAP2	králičí	1:1000, BSA	1:50	75,82,280	Cell Signaling Technology	4542
NF-H	myší	1:1000, mléko	1:400	180-220	Cell Signaling Technology	2836
nestin	myší	x	1:200	200	Merck	MAB5326
nestin	myší	1:2000, BSA	x	200	Cell Signaling Technology	33475

vinkulin	králičí	1:1000, BSA	x	124	Cell Signaling Technology	13901
NF-L	králičí	1:1000, BSA	1:100	70	Cell Signaling Technology	2837
Akt	králičí	1:1000, BSA	1:200	60	Cell Signaling Technology	9272
p-Akt	králičí	1:1000, BSA	1:400	60	Cell Signaling Technology	4060
β3-tubulin	králičí	1:1000, BSA	1:400	55	Cell Signaling Technology	5568
NeuN	králičí	1:1000, BSA	1:50	46-55	Cell Signaling Technology	24307
GFAP	králičí	1:1000, mléko	1:200	50	Cell Signaling Technology	12389
Pax6	králičí	1:1000, BSA	1:600	50	Cell Signaling Technology	60433
aktin (HRP konjugát)	myší	1:2000, TBST	x	45	Cell Signaling Technology	12620
Nanog	myší	1:1000, BSA	1:2000	42	Cell Signaling Technology	4893
Sox2	králičí	1:1000, BSA	1:400	35	Cell Signaling Technology	23064
S6	králičí	1:1000, mléko	1:100	32	Cell Signaling Technology	2317
p-S6	králičí	1:1000, BSA	1:150	32	Cell Signaling Technology	4858
4E-BP1	králičí	1:1000, BSA	1:1600	15-20	Cell Signaling Technology	9644
p-4E-BP1	králičí	1:1000, BSA	1:1600	15-20	Cell Signaling Technology	2855

histon H3	králičí	1:1000, mléko	x	17	Cell Signaling Technology	12648
LC3b-II	králičí	1:1000, BSA	1:100	14, 16	Cell Signaling Technology	2775

- Sekundární protilátky pro western blot:
 - Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (#115-035-003; Jackson ImmunoResearch)
 - Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (#111-035-003; Jackson ImmunoResearch)
 - Peroxidase Goat Anti-Mouse secondary antibody a Peroxidase Goat Anti-Rabbit secondary antibody (#111-035-003; Jackson ImmunoResearch)
- Sekundární protilátky pro imunocytochemii:
 - Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (#A32723; Invitrogen)
 - Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 594 (#A32744; Invitrogen)
- Sekundární protilátka pro imunohistochemii:
 - Goat anti-rabbit IgG antibody (H+L), biotinylated (#BA-1000) (Vectorlabs)

4.1.3. Analýza buněk Western Blot

Buňky byly homogenizovány na ledu v lyzačním RIPA pufru (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8), 1% Triton X-100, 0,5% deoxycholát sodný, 0,1% dodecylsírán sodný), který obsahoval proteázový a fosfatázový inhibitor (Thermo Scientific). Homogenizované buňky byly inkubovány 4°C po dobu 40 minut a poté centrifugovány za podmínek 14 000 RPM a 4 °C po dobu 20 minut na centrifuze 5804 R (Eppendorf). Tímto způsobem získaný supernatant byl zamražen při -80°C.

Pro stanovení koncentrace bylo provedeno spektrofotometrické měření pomocí softwaru i-control na přístroji Infinite® 200 PRO Multimode Reader (Tecan) s použitím sady PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Ke vzorkům byl přidán SDS vzorkový pufr (80 mM Tris (pH 6,8), 2% SDS, 10% glycerol, 0,006% bromfenolová

modř, 0,1 M DTT). Byla provedena elektroforéza s použitím gelů Mini-PROTEAN TGX™ Precast Gels (Bio-Rad) s gradientem (8–14 %) a elektroforézového pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS). Nanáška do jamek byla 10 µg proteinu na jamku gelu.

Po skončení elektroforézy byl proveden transfer proteinů z gelů na PVDF membrány (Life Technologies) v transferovém pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, pH 8.3; spolu s 20% methanolu (v/v)) metodou Western Blot. Pro zvýraznění proteinů byly membrány obarveny roztokem Ponceau S Staining Solution (Cell Signaling Technology). Pro proplachování membrán mezi jednotlivými kroky byl použit Tris-buffered saline/Tween-20 (TBST) pufr (20 mM Tris, 150 nM NaCl, 0,1% Tween 20; pH 7,5).

Před imunodetekcí proteinů byly membrány inkubovány s 5% roztokem mléka (Cell Signaling Technology). Takto byla u membrán blokována nespecifická vazebná místa. Membrány byly s roztoky primárních protilátek inkubovány přes noc ve 4°C. Protilátky byly připraveny v 5% roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) (Cell Signaling Technology) nebo v 5% roztoku mléka (Cell Signaling Technology), případně přímo v TBST. Po inkubaci byly membrány omyty v TBST a inkubovány s příslušnými sekundárními protilátkami. Ty byly ředěny v TBST v poměru 1:10 000. Inkubace se sekundárními protilátkami probíhala po jednu hodinu na kývačce při laboratorní teplotě, poté byly membrány opět propláchnuty TBST roztokem. Pro vyvolání byly k membránám přidány vyvolávací roztoky (SuperSignal™ West Dura, ThermoScientific). Měření bylo provedeno na přístroji Azure c600 (Azure Biosystems) s pomocí programu Capture software. Výsledky byly normalizovány vůči vysokomolekulárnímu vinkulinu, a nízkomolekulárnímu aktinu a histonu H3. Jedná se o běžně se v buňce vyskytující proteiny.

Po vyvolání byl provedeno odmývání. Membrány byly na 30 minut ponořeny do odmývacího pufru (0,1 M Gly-HCl, 0,5 M NaCl, pH 2,7) a poté promyty roztokem TBST. Další postup byl stejný jako u imunodetekce popsané výše. Po hodinové blokaci s roztokem mléka byly přidány primární protilátky, následovala noční inkubace v chladu, přidání sekundárních protilátek a vyvolání. Po získání dat byla relativní intenzita signálu zjištěna pomocí softwaru Fiji. Normalizace byla provedena vůči datům získaným z měření signálů vinkulinu, aktinu a histonu H3 podle molekulové hmotnosti konkrétní primární protilátky.

4.2. Metody *in vivo* experimentu

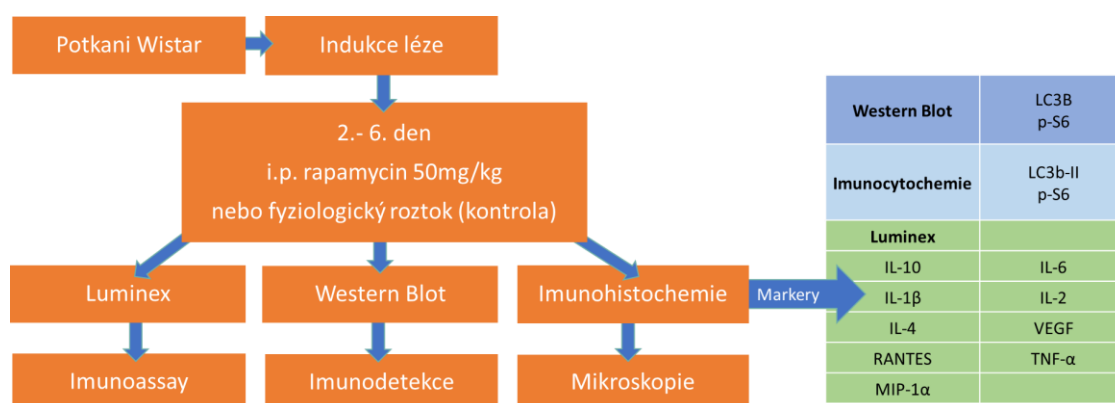


Schéma 2: Metody *in vivo* experimentu. Potkanům Wistar byla indukována míšní léze zavedenou metodou. Druhý až šestý den po zákroku byl potkanům podáván rapamycin (50 mg/kg), nebo placebo v případě kontrolní skupiny. Sedmý den po zákroku byla zvířata usmrcena. Jejich míchy byly vyjmuty a zpracovány pro analýzu. Bylo použito imunohistochemické barvení a western blot v kombinaci s imunodetekcí pro detekci markerů autofagie a vlivu rapamycinu na mTOR dráhu. Byl zjištěn vliv rapamycinu na produkci cytokinů v míšní tkáni pomocí metody imunoassay a přístroje Luminex.

4.2.1. Indukce míšního poranění u potkanů

Pro *in vivo* experiment (schéma 2) byli použiti samci potkanů druhu Wistar (n = 25). Zvířata byla rozdělena celkem do tří skupin: kontrolní skupina bez léze (n = 2) a skupina, u které bylo chirurgicky navozeno míšní poranění. Pro indukci léze byl využit zavedený kompresní model míšního poranění (Vanický et al., 2001). Zvířata po zákroku byla rozdělena do dvou skupin: první skupina, které byl podáván fyziologický roztok jako placebo (n = 12); a druhá skupina, které byl podáván rapamycin v dávce 50 mg/kg jedenkrát denně (n = 11). Toto probíhalo v časovém úseku od druhého až po šestý den po indukci léze. Zvířata tedy celkem dostala pět dávek rapamycinu. Oběma skupinám byly látky podávány intraperitoneálně. Zvířata byla usmrcena sedmý den po zákroku.

Počet zvířat využitých v tomto experimentu byl v souladu se směrnicí Rady Evropské unie ze dne 22. září 2010 (210/63/EU) co nejnížší, jak jen bylo statisticky možné. Experimentální postupy byly schváleny Etickou komisí Ústavu experimentální medicíny AV ČR.

4.2.2. Analýza tkáně Western Blot

Míchy potkanů byly po usmrcení zvířat vyjmuty a uskladněny při teplotě -80°C . Oblasti tkáně okolo místa poranění byly po extrakci vloženy do RIPA pufru (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8), 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 0,5% deoxycholát sodný, 0,1% dodecylsírán sodný), který obsahoval fosfatázový (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Sigma) a proteázový (PhosphoSTOP™ EASYpack, Roche, Sigma) inhibitor. Vzorky tkáně byly v pufru na ledu homogenizovány, sonikovány a vortexovány. Následovala centrifugace po dobu 15 minut při 4°C a 14 000 RPM. Koncentrace proteinů v získaném supernatantu byla stanovena pomocí Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

Pro elektroforézu byly použity gely Mini-PROTEAN TGX™ Stain-free Gels (Bio-Rad) s gradientem 4–15%. Do jamek gelu bylo nanášeno po 25 μg proteinu. Po proběhnutí separace byl gel aktivován pomocí UV lampy s vlnovou délkou 302 nm. Aktivace trvala 2 minuty, a záznam byl proveden pomocí přístroje Azure c400 (Azure Biosystems). Transfer proteinů byl proveden výše popsáním způsobem metody Western Blot na PVDF membránu (Life Technologies). Fluorescenční proteiny na membráně byly vizualizovány opět pomocí přístroje Azure c400.

Blokace byla provedena podle typu použité protilátky, a to buď 5% roztokem BSA (Sigma) nebo 5% roztokem sušeného mléka (Cell Signaling Technology) v TBST. Membrány byly inkubovány přes noc při 4°C s roztoky primárních protilátek (viz tabulka 1), omyty v TBST a inkubovány s příslušnými sekundárními protilátkami v roztoku TBST. Sekundární protilátky byly ředěny 1:10 000 a konjugovány s avidin-peroxidázou (HRP). Vizualizace proteinů byla provedena využitím chemiluminiscence. Ta byla indukována prostřednictvím Clarify™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) a vyvolána na přístroji Azure c400. Relativní intenzita signálu byla zjištěna softwarem Fiji a normalizována vůči celkovému obsahu proteinu v gelech.

4.2.3. Imunohistochemie

Při imunohistochemii byly použity zvířata ze dvou skupin. Jedna byla po SCI v průběhu experimentu ošetřena rapamycinem ($n = 5$), druhé bylo podáváno placebo ($n = 5$). U pokusných zvířat byla provedena transkardiální perfuse 4% paraformaldehydem ve fosfátovém pufru sedm dní po chirurgické indukci míšní léze a

zvířata byla usmrcena předávkováním pentobarbitalem (100 mg/kg). Potkanům byla vyjmuta páteř, která byla fixována přes noc ve 4% PFA. Z takto zpracovaných vzorků byla vyextrahována míšní tkáň v blízkosti poranění, konkrétně 1 cm rostrálně a 1 cm kaudálně od středu léze. Extrahovaná tkáň byla uchována za sterilních podmínek ve fosfátovém pufru.

Jednotlivé části tkáně byly poté zapuštěny do parafinu a příčně nařezány na řezy o tloušťce 5 μ m. Takto získané řezy byly inkubovány s primárními protilátkami (viz tabulka 1). Po skončení inkubace s primárními protilátkami následovaly biotinylované sekundární protilátky (Vectorlabs), které byly ředěny 1:300. Pro detekci byl využit VECTASTAIN®ABC Kit (Vectorlabs). Barvení hematoxylinem bylo využito k vizualizaci buněčných jader. Příčné řezy byly zdokumentovány mikroskopem LEICA CTR 6500 (Leica Microsystems) se softwarem FAXS 4.2.6245.1020 (TissueGnostics). Z takto získaných dat byl prostřednictvím softwaru HistoQuest 4.0.4.0154 (TissueGnostics) zjištěn počet p-S6 a LC3b-II pozitivních buněk na mm².

4.2.4. Analýza cytokinů

Pomocí zavedeného postupu (Urdzíková et al., 2014) byly změřeny hladiny cytokinů, k jejichž produkci dochází u zvířat po SCI, kterým byl podáván rapamycin (n = 6) nebo placebo (n = 7). Po usmrcení zvířat byl extrahován úsek míchy z oblasti léze o přibližné délce 2 mm. Získaná tkáň byla inkubována v médiu (DMEM, Sigma; 10% FBS; 0,2% primocin) po dobu 24 hodin, a toto médium bylo po skončení inkubace analyzováno. S použitím upravené sady Milliplex inflammatory cytokine immunoassay kit (Millipore) bylo v médiu stanoveno množství jednotlivých cytokinů uvolněných z extrahované míšní tkáně. Pro tento účel byly použity 96-jamkové destičky, jejichž jamky byly potaženy primárními protilátkami proti specifickým cytokinům (interleukiny IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-4, vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), RANTES (z anglického regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), TNF- α , makrofágový zánětlivý protein (MIP-1 α). Jamky destiček byly inkubovány s médiem, a po dokončení inkubace a odmytí nenavázaného média k nim byla přidána primární detekční protilátka konjugovaná s biotinem. Detekce analytu byla provedena pomocí streptavidinu-RPE (Life Technologies). Intenzita fluorescenční značky byla změřena přístrojem Luminex 200™ System (Luminex) a analyzována pomocí softwaru Magpix. Hodnoty koncentrací

jednotlivých cytokinů byly vypočítány s použitím kalibrační křivky získané měřením sedmi standardních koncentrací.

4.3. Statistické vyhodnocení dat

Data získaná z *in vitro* buněčného experimentu byla vyjádřena jako průměr \pm standardní chyba průměru. Pro vyhodnocení rozdílů mezi skupinami byl použit Studentův t-test. Pro zjištění statisticky významných rozdílů mezi výsledky získaných od jednotlivých skupin experimentálních zvířat při *in vivo* experimentu byla využita jednosměrná ANOVA. Následoval Student–Newman–Keulsův test pro opakované měření (Sigmastat 3.1, Systat Software Inc.). Data byla vynesena pomocí softwaru GraphPad Prism (verze 5.0.0 pro Windows) jako průměr \pm standardní chyba průměru. Úroveň statistické významnosti byla označena takto: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ pro *in vitro* i *in vivo* experimenty. Rozdíly byly považovány za významné při $p < 0,05$.

5. Výsledky

5.1. Buněčný experiment

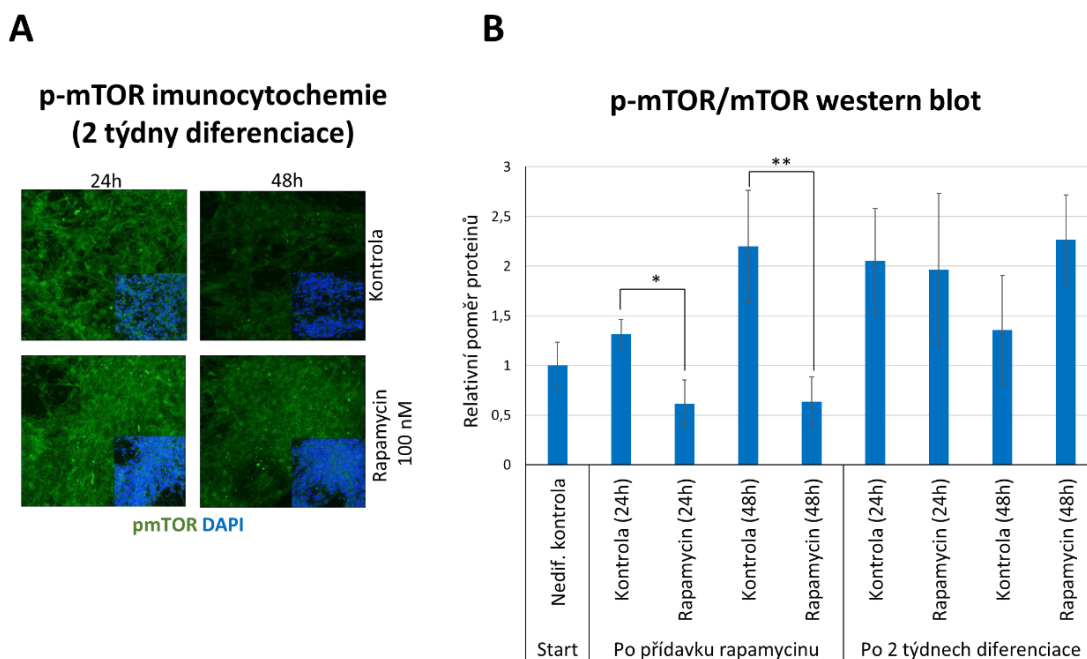
Abychom zjistili vliv rapamycinu na mTOR signální kaskádu NSC, byla provedena zevrubná analýza buněk kultury metodami western blot a imunocytochemie. Detekovány byly proteiny mTOR signalizační kaskády (p-mTOR, mTOR, p-4E-BP1, 4E-BP1, p-S6, S6, p-Akt, Akt) a bylo zjištěno, jaký vliv měla inhibice rapamycinem na jejich hladiny během diferenciaci a proliferace NSC. Také byly detekovány buněčné markery typické pro diferenciaci a proliferaci NSC. U diferenciaci se jednalo o neurální marker NeuN (z anglického Neuronal Nuclei), gliální fibrilární acidický protein (GFAP), protein asociovaný s mikrotubuly 2 (MAP2), protein intermediárního filamenta neurofilament H (NF-H) a mikrotubulární protein β 3-tubulin. V případě proliferace byly detekovány markery Sox2 (z anglického sex determining region Y (SRY) - box 2), Pax-6 (z anglického paired box 6), transkripční faktor Nanog, a jaderný protein Ki-67, který je známý také podle genu, který jej kóduje, jako protein MKI67 (z anglického marker of proliferation Ki-67). Byl zkoumán vliv rapamycinu na hladiny těchto markerů během proliferace a diferenciaci.

mTOR kináza má aktivní, fosforylovanou formu p-mTOR. Množství mTOR zůstává v buňce neměnné, zatímco množství fosforylované formy osciluje a vypovídá o tom, jak moc je kináza aktivní. Přídavek rapamycinu coby inhibitoru dráhy by tedy měl snížit hladinu p-mTOR, zatímco hladina mTOR by měla zůstat neměnná, což se odrazí na relativním poměru těchto dvou proteinů. Pomocí metod imunocytochemie a western blot byl analyzován vliv rapamycinu na hladiny p-mTOR a mTOR během diferenciaci NSC (obr. 6). Výsledky imunocytochemického barvení po dvou týdnech diferenciaci (obr. 6A) spolu s výsledky analýzy western blot provedené se všemi vzorky z diferenciačního experimentu (obr. 6B) ukazují, že k blokaci p-mTOR docházelo po 24 a 48 hodin po aplikaci rapamycinu, ale už ne po dvou týdnech diferenciaci. Signifikantní rozdíly byly pozorovány mezi kontrolou a skupinou s rapamycinem po 24 hodinách ($p < 0,05$) a po 48 hodinách ($p < 0,01$).

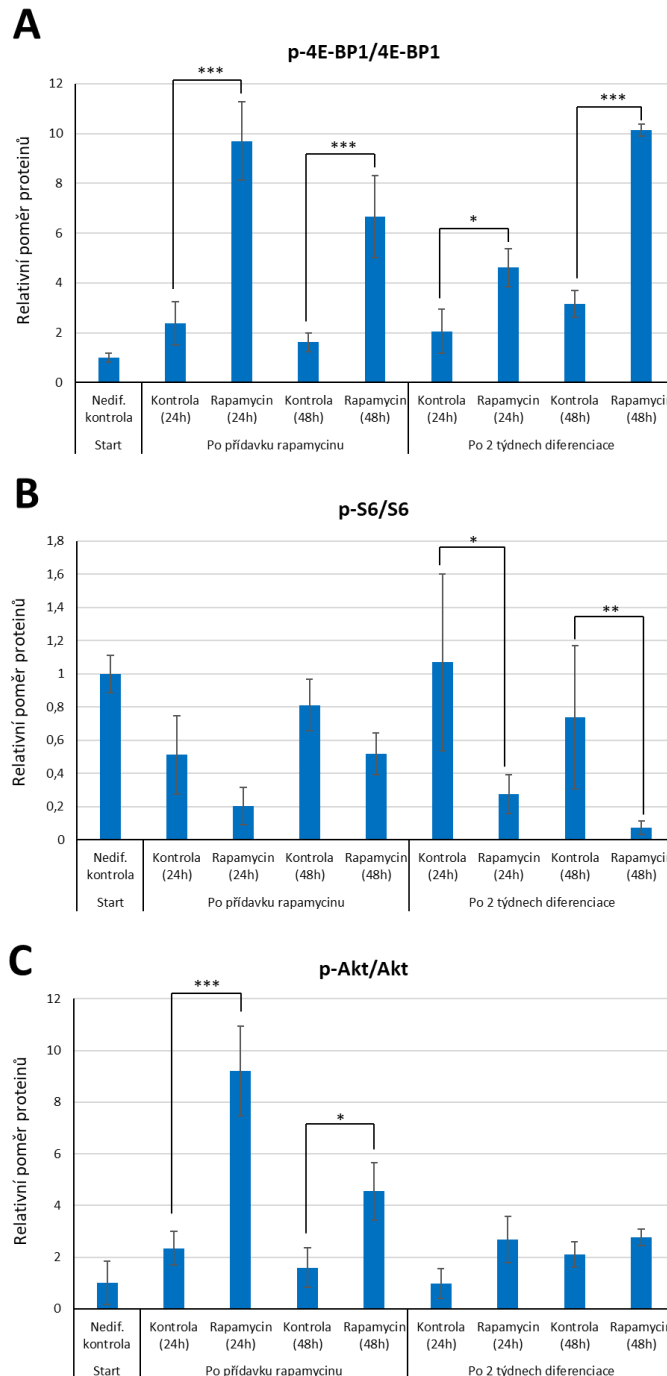
4E-BP1 je v signalizační kaskádě spolu s S6 pod vlivem mTOR kinázové aktivity (kap. 2. 2. 2., obr. 4), konkrétně pod kontrolou komplexu mTORC1. Podobně jako mTOR mají 4E-BP1 a S6 aktivní, fosforylovanou formu. Aktivita obou dvou těchto proteinů je

zprostředkována aktivitou mTOR. p-mTOR indukuje fosforylaci 4E-BP1 na p-4E-BP1 a S6 na p-S6. Díky tomu dochází k iniciaci translace a syntéze proteinů. Přítomnost p-4E-BP1 a p-S6 tak vypovídá o probíhající mTOR signalizaci. Kináza Akt je důležitým členem mTOR signalizace, především pro dráhy související s mTORC2, ale má vliv i na signalizaci mTORC1 (kap. 2. 2. 2., obr. 3). Všechny tyto proteiny mTOR kaskády a jejich fosforylované formy byly analyzovány metodami imunocytochemie a western blot. Byl zkoumán vliv inhibice rapamycinem na jejich hladiny během diferenciaci NSC.

Vliv rapamycinu byl na relativním poměru proteinů p-4E-BP1 a 4E-BP1 (obr. 7A) vidět jak po podání rapamycinu, tak i po dvou týdnech diferenciaci. Signifikantní rozdíly mezi hladinami pro kontrolní skupinu buněk a pro skupinu, které byl podáván rapamycin, byly detekovány po 24 ($p < 0,001$) a 48 hodinách ($p < 0,001$), a po dvou týdnech diferenciaci u skupin po 24 ($p < 0,05$) a 48 hodinách ($p < 0,001$).



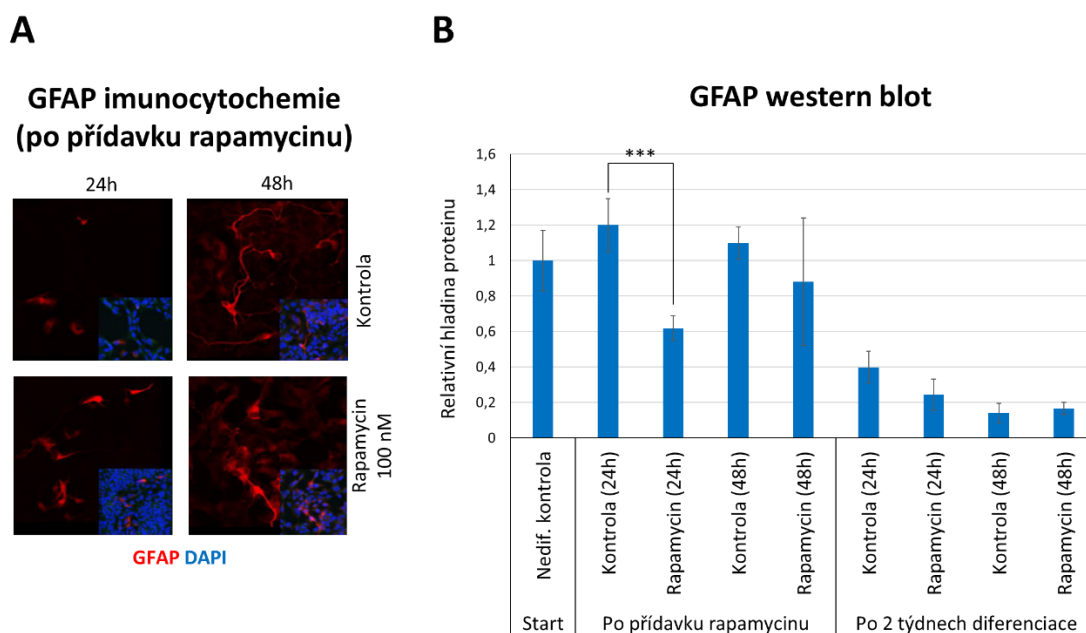
Obrázek 6: Vliv rapamycinu na mTOR při diferenciaci neurálních kmenových buněk (NSC). Výsledky imunocytochemického barvení zafixovaných NSC protilátkou proti p-mTOR a DAPI (A). Buňky byly zafixovány po 2 týdnech diferenciaci. Nahoře jsou buňky kontrolních skupin, dole skupiny buněk, kterým byl podáván rapamycin. Nalevo jsou buňky 24 hodin po aplikaci rapamycinu, vpravo po 48 hodinách. Byla provedena analýza metodou western blot (B). Míra fosforylace proteinů byla zjištěna porovnáním intenzit normalizovaných fosforylovaných a nefosforylovaných zón proteinů. Byly porovnány hladiny proteinů v nediferencovaných buňkách, buňkách bez rapamycinu a buňkách po přidavku rapamycinu. K blokaci aktivity mTOR rapamycinem docházelo ihned po přidání rapamycinu, po 2 týdnech už nebylo snížení hladin signifikantní. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



Obrázek 7: Analýza vlivu rapamycinu pomocí metody western blot na proteiny mTOR dráhy v průběhu diferenciacce neurálních kmenových buněk (NSC). Míra fosforylace proteinů byla zjištěna porovnáním intenzit normalizovaných fosforylovaných a nefosforylovaných zón proteinů. Byly porovnány hladiny proteinů v nediferencovaných buňkách, buňkách bez rapamycinu a buňkách po přidavku rapamycinu. Hladiny p-4E-BP1/4E-BP1 byly zvýšené u NSC po přidavku rapamycinu oproti kontrole po celou dobu experimentu (A). U p-S6/S6 došlo k signifikantnímu snížení u buněk, kterým byl podán rapamycin, a to především po dvou týdnech diferenciacce (B). Hladiny p-Akt/Akt byly ovlivněny po přidavku rapamycinu, ale už ne po dvou týdnech diferenciacce (C). Zobrazená data jsou uvedena jako průměr \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

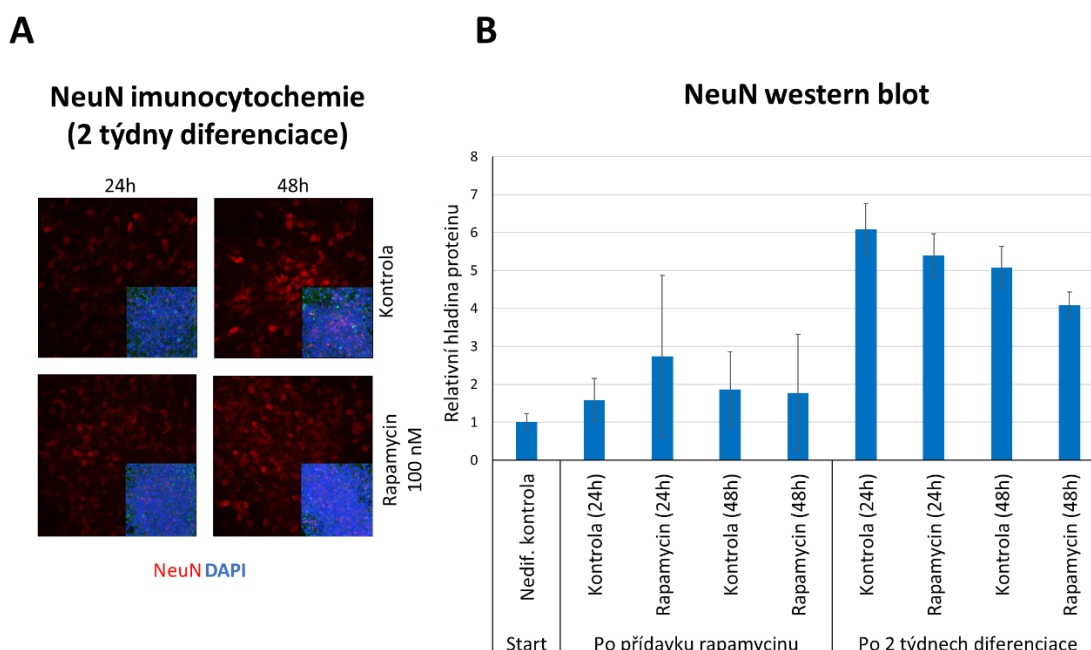
Pro p-S6/S6 (obr. 7B) bylo u buněk, kterým byl podán rapamycin, detekováno signifikantní snížení hladin po dvou týdnech diferenciaci oproti kontrolní skupině. Jednalo se o vzorky 24 ($p < 0,05$) a 48 hodin ($p < 0,01$) po aplikaci rapamycinu. Relativní poměr p-Akt/Akt byl přidavkem rapamycinu signifikantně snížen ve vzorcích po 24 ($p < 0,001$) a 48 hodinách ($p < 0,05$), ale už ne po dvou týdnech diferenciaci (obr. 7C).

Pro zjištění vlivu rapamycinu na diferenciaci NSC byly detekovány markery typické pro neurální a gliální fenotyp. GFAP je důležitá součást astrocytárního cytoskeletu a využívá se jako marker buněčné diferenciaci do gliálního fenotypu. Na výsledcích z western blot (obr. 8B) je patrné, že po přidání rapamycinu došlo ke snížení hladiny markeru, především během prvních 24 hodin ($p < 0,001$), což je vidět i na výsledcích imunocytochemického barvení (obr. 8A). GFAP pozitivní buňky nebyly v kultuře po dvou týdnech diferenciaci téměř detekovány.



Obrázek 8: Analýza vlivu rapamycinu na hladiny GFAP v průběhu diferenciaci neurálních kmenových buněk (NSC). Imunocytochemické barvení zafixovaných NSC protilátkou proti GFAP a DAPI (A). Nahoře jsou zafixované buňky kontrolních skupin, dole skupiny buněk, kterým byl podáván rapamycin. Nalevo jsou buňky 24 hodin po aplikaci rapamycinu, vpravo po 48 hodinách. Analýza metodou western blot (B). Byly porovnány hladiny proteinů v nediferencovaných buňkách, buňkách bez rapamycinu a buňkách po přidavku rapamycinu. K signifikantnímu snížení mezi kontrolní skupinou a skupinou s rapamycinem došlo 24 hodin po podání rapamycinu. Po dvou týdnech diferenciaci nebyl marker v kultuře už téměř detekován. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr \pm SEM; *** $p < 0,001$.

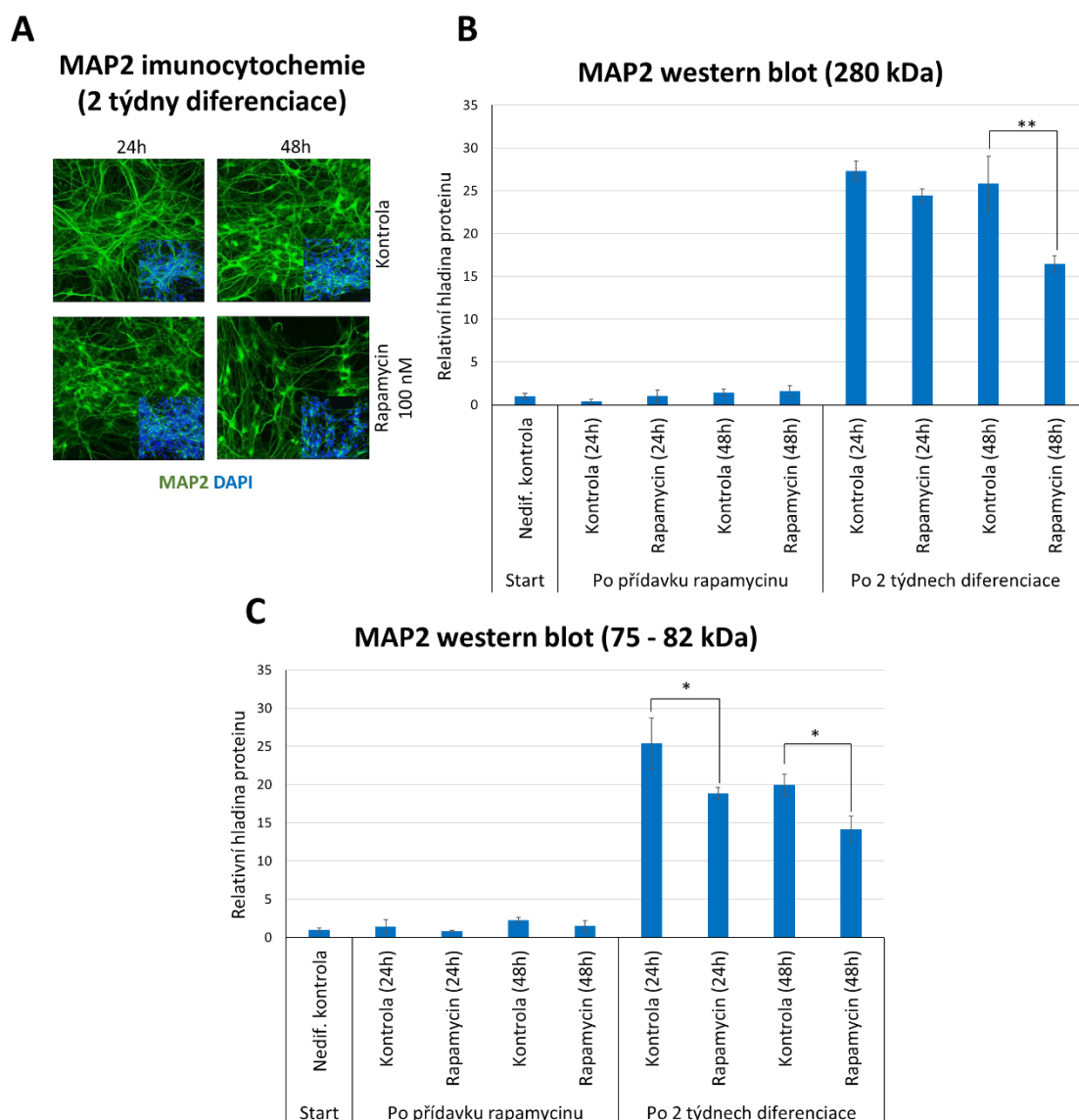
Typickými markery neurální diferenciace jsou jaderný protein NeuN a marker zralých neuronů MAP2, který patří do rodiny proteinů asociovaných s mikrotubuly. Hladiny NeuN byly detekovány metodami imunocytochemie (obr. 9A) a western blot (obr. 9B). Z výsledků western blot je patrné, že zatímco po podání rapamycinu byly hladiny markeru nízké, po dvou týdnech diferenciace došlo k jejich výraznému nárůstu. Rozdíly mezi hladinami proteinu naměřené u kontrolních skupin NSC a u skupin NSC s rapamycinem nebyly signifikantní. Výsledky analýzy NeuN korelují s výsledky pro MAP2 (obr. 10).



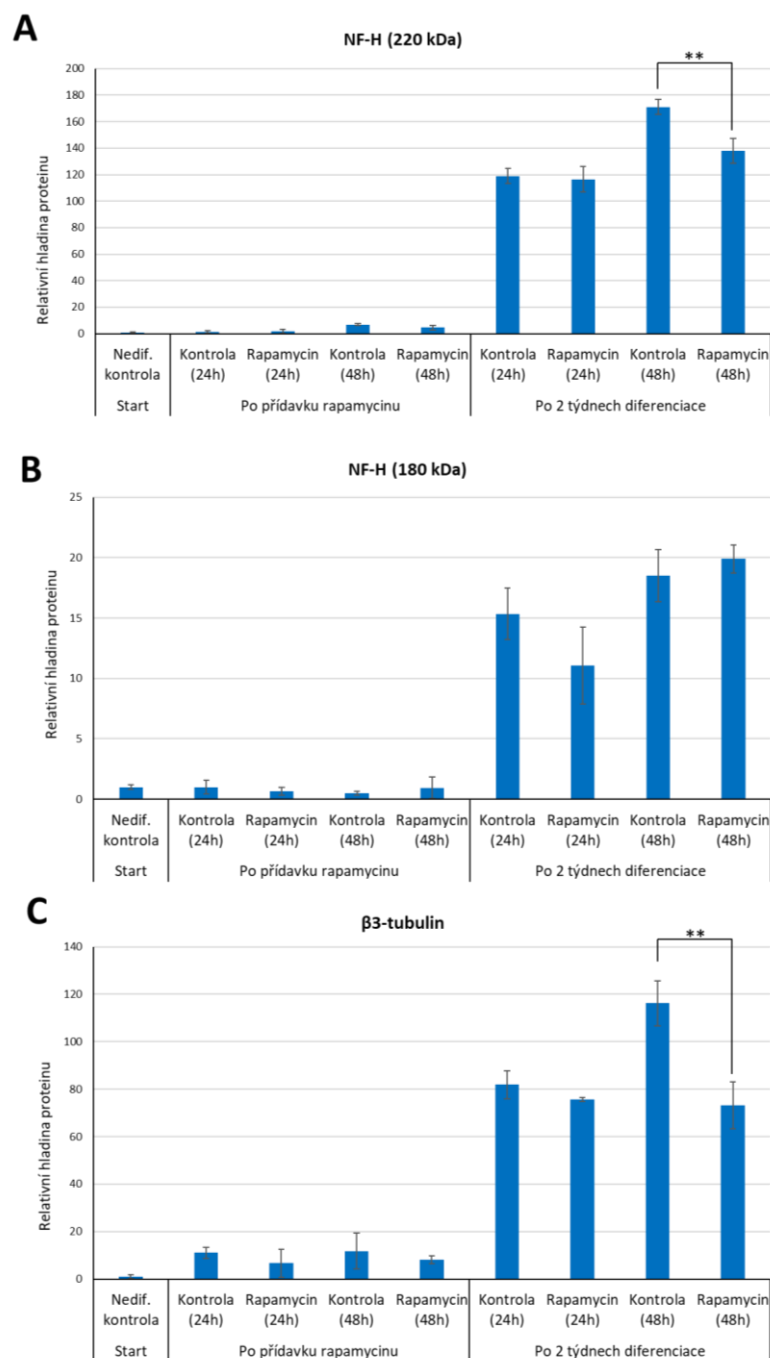
Obrázek 9: Analýza vlivu rapamycinu na hladiny NeuN v průběhu diferenciace neurálních kmenových buněk (NSC). Výsledky imunocytochemického barvení zafixovaných NSC protilátkou proti NeuN a DAPI (A). Buňky byly zafixovány po 2 týdnech diferenciace. Nahoře jsou buňky kontrolních skupin, dole skupiny buněk, kterým byl podáván rapamycin. Nalevo jsou buňky 24 hodin po aplikaci rapamycinu, vpravo po 48 hodinách. Byla provedena analýza metodou western blot (B) a porovnány hladiny proteinů v nediferencovaných buňkách, buňkách bez rapamycinu a buňkách po přidavku rapamycinu. Mezi detekovány hladinami nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr \pm SEM.

Přítomnost MAP2 pozitivních buněk v kultuře NSC byla pozorována po dvou týdnech diferenciaci, což je vidět na výsledcích imunocytochemického barvení (obr. 10A) a na výsledcích western blot analýzy (obr. 10B–C). MAP2 je v neuronech exprimován v několika izoformách. Z tohoto důvodu byly při vyhodnocování výsledků western blot detekovány na membráně dvě zóny, jedna o molekulové hmotnosti 280 kDa (obr. 10B) a druhá o hmotnosti v rozsahu 75–82 kDa (obr. 10C). Výsledky analýzy 280 kDa zóny ukázaly nárůst markeru po dvou týdnech diferenciaci. Signifikantní rozdíl mezi hladinami naměřenými pro kontrolní skupinu NSC a pro skupinu NSC s rapamycinem byl detekován ve skupině 48 hodin po aplikaci rapamycinu ($p < 0,01$). Analýza zóny 75–82 kDa potvrdila nárůst hladiny markeru po dvou týdnech diferenciaci. Signál ze zóny 280 kDa byl silnější než ze zóny 75–82 kDa. Signifikantní rozdíly mezi hladinami u kontroly a u buněk s rapamycinem byly detekovány po dvou týdnech diferenciaci, u skupin NSC 24 ($p < 0,05$) a 48 hodin po aplikaci rapamycinu ($p < 0,05$).

Hladiny neurofilamentu H byly během diferenciačního experimentu NSC analyzovány metodou western blot (obr. 11A–B). Podobně jako u MAP2 jsou i u tohoto proteinu detekovány dvě zóny, jedna o molekulové hmotnosti 220 kDa (obr. 11A) a druhá o molekulové hmotnosti 180 kDa (obr. 11B). Byl detekován nárůst hladin po dvou týdnech diferenciaci u kontrolní skupiny buněk a stejně tak u skupiny s ošetřením rapamycinem. Signifikance mezi hladinami kontrolní skupiny NSC a skupinou NSC s rapamycinem byla detekována u 220 kDa po dvou týdnech diferenciaci u buněk 48 hodin po aplikaci rapamycinu ($p < 0,01$). Nárůst hladin po dvou týdnech diferenciaci se signifikací mezi stejnými dvěma skupinami vykazoval při analýze western blot i β 3-tubulin (obr. 11C) ($p < 0,01$).



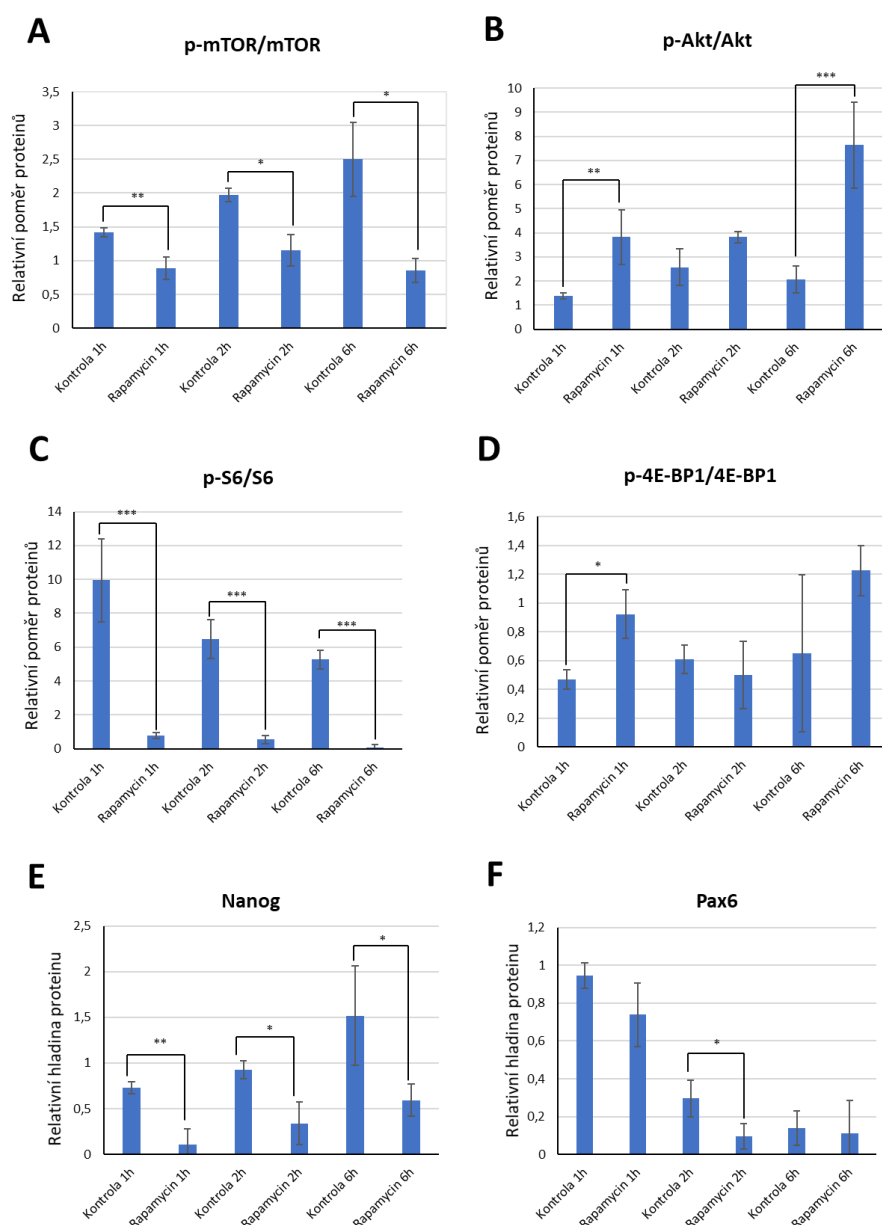
Obrázek 10: Analýza vlivu rapamycinu na hladiny MAP2 v průběhu diference neurálních kmenových buněk (NSC). Zafixované NSC byly podrobeny imunocytochemickému barvení protilátkou proti MAP2 a DAPI (A). Buňky byly zafixovány po 2 týdnech diference. Nahoře jsou buňky kontrolních skupin, dole skupiny buněk, kterým byl podáván rapamycin. Nalevo jsou buňky 24 hodin po aplikaci rapamycinu, vpravo po 48 hodinách. Byla provedena analýza metodou western blot proteinových zón o molekulové hmotnosti 220 kDa (B) a 75–82 kDa (C). Byly porovnány hladiny proteinů v nediferencovaných buňkách, buňkách bez rapamycinu a buňkách po přidavku rapamycinu. Relativní hladina proteinu byla zvýšena u všech buněk po dvou týdnech diference. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr ± SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



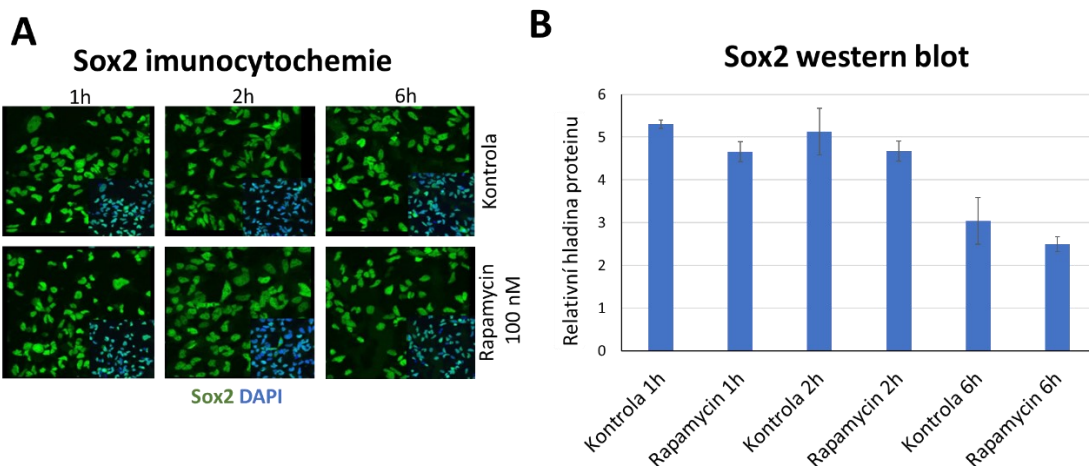
Obrázek 11: Analýza vlivu rapamycinu na hladiny neurofilamentu H (NF-H) a β 3-tubulinu v průběhu diferenciacie neurálních kmenových buněk (NSC). Výsledky analýzy pomocí metody western blot. Byly porovnány hladiny proteinů v nediferencovaných buňkách, buňkách bez rapamycinu a buňkách po přidavku rapamycinu. Pro NF-H byly detekovány a vyhodnoceny dvě proteinové zóny o molekulové hmotnosti 220 kDa (**A**) a 180 kDa (**B**). Došlo ke zvýšení NF-H po dvou týdnech diferenciacie u buněk kontroly i u buněk s rapamycinem. β 3-tubulin byl analyzován stejným způsobem (**C**). Zvýšení jeho hladin bylo detekováno po dvou týdnech, signifikantní rozdíl mezi hladinami u kontrolní skupiny NSC a u skupiny ošetřené rapamycinem byl pozorován po 48 hodinách. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr \pm SEM; ** $p < 0,01$.

Vliv rapamycinu na mTOR dráhu při proliferaci NSC byl analyzován pomocí metod western blot (obr. 12A–D) a imunocytochemie (data neukázána). Relativní poměr p-mTOR/mTOR (obr. 12A) byl u NSC snížen přidavkem rapamycinu v porovnání s kontrolní skupinou, a to jak po jedné ($p < 0,01$), dvou ($p < 0,05$) i po 6 hodinách ($p < 0,05$) proliferace. Hodnoty p-Akt/Akt (obr. 12B) naměřené u NSC po přidání rapamycinu byly oproti kontrolní skupině zvýšeny především po jedné ($p < 0,01$) a 6 hodinách ($p < 0,001$). Výsledky pro p-S6/S6 (obr. 12C) kopírovaly hodnoty naměřené pro p-mTOR/mTOR. Došlo ke signifikantnímu snížení hladin ve skupině s rapamycinem oproti kontrole po jedné ($p < 0,001$), dvou ($p < 0,001$) a po 6 hodinách ($p < 0,001$) proliferace. Analýza p-4E-BP1/4E-BP1 (obr. 12D) ukázala signifikantní rozdíl mezi kontrolou a vzorkem ošetřeným rapamycinem jen po první hodině proliferace ($p < 0,05$).

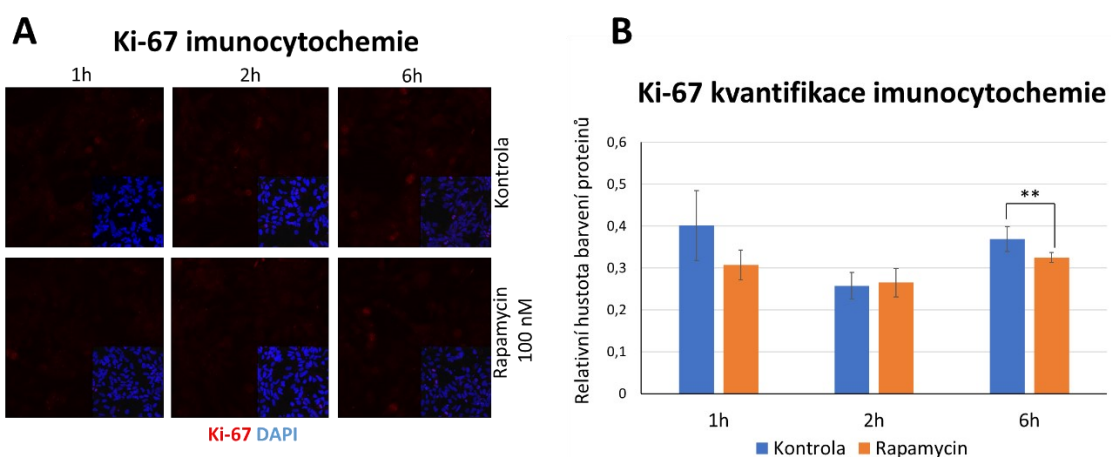
Pro zjištění vlivu rapamycinu na proliferaci NSC byla provedena detekce markerů Nanog a Pax6 metodou western blot (obr. 12E–F) a imunocytochemie (data neukázána). V případě Nanog byla pozorována signifikantně nižší hladina u skupiny NSC, kterým byl podán rapamycin, v porovnání s kontrolní skupinou. Inhibice přetrvala po celou dobu proliferačního experimentu a na výsledcích western blot (obr. 12E) je vidět po jedné ($p < 0,01$), dvou ($p < 0,05$) i 6 hodinách ($p < 0,05$). Hladina Pax6 (obr. 12F) se v průběhu proliferačního experimentu snižovala u kontrolní skupiny NSC i u skupiny, která byla ošetřena rapamycinem. Signifikantní rozdíl mezi hladinami byl detekován pouze u skupiny po 2 hodinách proliferace ($p < 0,05$). Dále byl detekován Sox2, marker raných neurálních progenitorů, opět pomocí metod western blot (obr. 13B) a imunocytochemie (obr. 13A). U tohoto markeru nebyla po podání rapamycinu pozorována žádná výrazná změna. Bylo provedeno imunocytochemické barvení Ki-67 (obr. 14A) a jeho kvantifikace (obr. 14B). Statisticky významné rozdíly mezi hodnotami naměřenými pro kontrolní skupinu NSC a skupinu NSC, kterým byl podáván rapamycin, byly popsány jen ve vzorcích po 6 hodinách proliferace ($p < 0,01$).



Obrázek 12: Vyhodnocení vlivu rapamycinu na proteiny mTOR dráhy během proliferace neurálních kmenových buněk (NSC) metodou western blot. Byl zkoumán inhibiční vliv proteiny mTOR signální dráhy - mTOR, Akt, S6 a 4E-BP1 a na jejich fosforylované, aktivní formy (A–D). Míra fosforylace proteinů byla zjištěna porovnáním intenzit normalizovaných fosforylovaných a nefosforylovaných zón proteinů. Byly porovnány hladiny proteinů v buňkách bez rapamycinu a buňkách po přidavku rapamycinu. Hladiny p-mTOR/mTOR (A) a p-S6/S6 (C) byly po přidavku rapamycinu sníženy už po 1 hodině a zůstaly snižené oproti kontrole i po 6 hodinách. U p-Akt/Akt (B) a p-4E-BP1/4E-BP1 (D) byl pozorován růst hladin u skupin buněk s rapamycinem. Byla provedena analýza western blot transkripčních faktorů důležitých pro proliferaci NSC. Hladiny Nanog byly u NSC po přidavku rapamycinu signifikantně sníženy oproti hodnotám pro kontrolu po 1, 2 i po 6 hodinách (E). Hladina Pax6 klesala v čase v kontrolních skupinách NSC i ve skupinách s rapamycinem (F). Jediný statisticky významný rozdíl mezi jejich hladinami byl zaznamenán po 2 hodinách proliferace. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr ± SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Obrázek 13: Vyhodnocení exprese Sox2 v neurálních kmenových buňkách (NSC) během proliferace po inhibici rapamycinem. Imunohistochemická analýza množství Sox2 v NSC během proliferace. NSC byly zafixovány a barveny protilátkou proti Sox2 a DAPI (A). Nahoře jsou buňky kontrolní skupiny. Dole jsou buňky, kterým byl přidán rapamycin. Zleva potom buňky 1, 2 a 6 hodin po aplikaci rapamycinu. Byla provedena analýza prostřednictvím metody western blot (B). Při porovnání množství markeru mezi jednotlivými skupinami buněk nebyly pozorovány výraznější změny. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr \pm SEM.



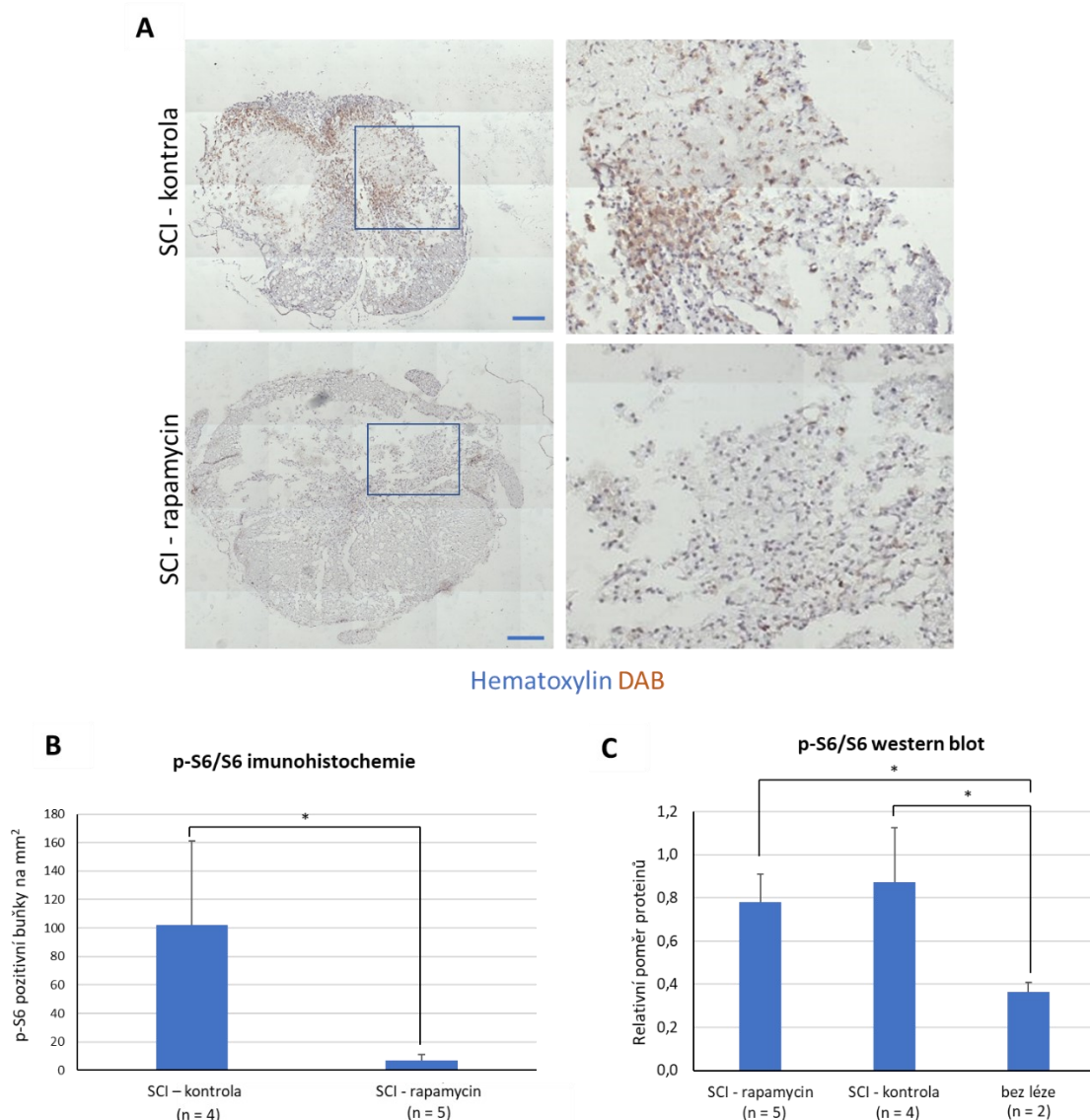
Obrázek 14: Výsledky analýzy vlivu rapamycinu na expresi Ki-67 v průběhu proliferace neurálních kmenových buněk (NSC). Imunocytochemická analýza množství Ki-67 v NSC buňkách během proliferačního experimentu. Zafixované buňky byly barveny protilátkou proti Ki-67 a DAPI (A). Nahoře jsou buňky kontrolní skupiny. Dole jsou buňky, kterým byl přidán rapamycin. Zleva potom buňky 1, 2 a 6 hodin po aplikaci rapamycinu. Výsledky imunocytochemického barvení byly kvantifikovány do grafu (B). Detekované množství pozitivních buněk bylo zprůměrováno a byly porovnány hodnoty pro kontrolní skupinu a pro skupinu s rapamycinem. Statisticky významný pokles hladiny Ki-67 po podání markeru byl zaznamenán po 6 hodinách proliferace. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr \pm SEM; ** $p < 0,01$.

5.2. In vivo experiment

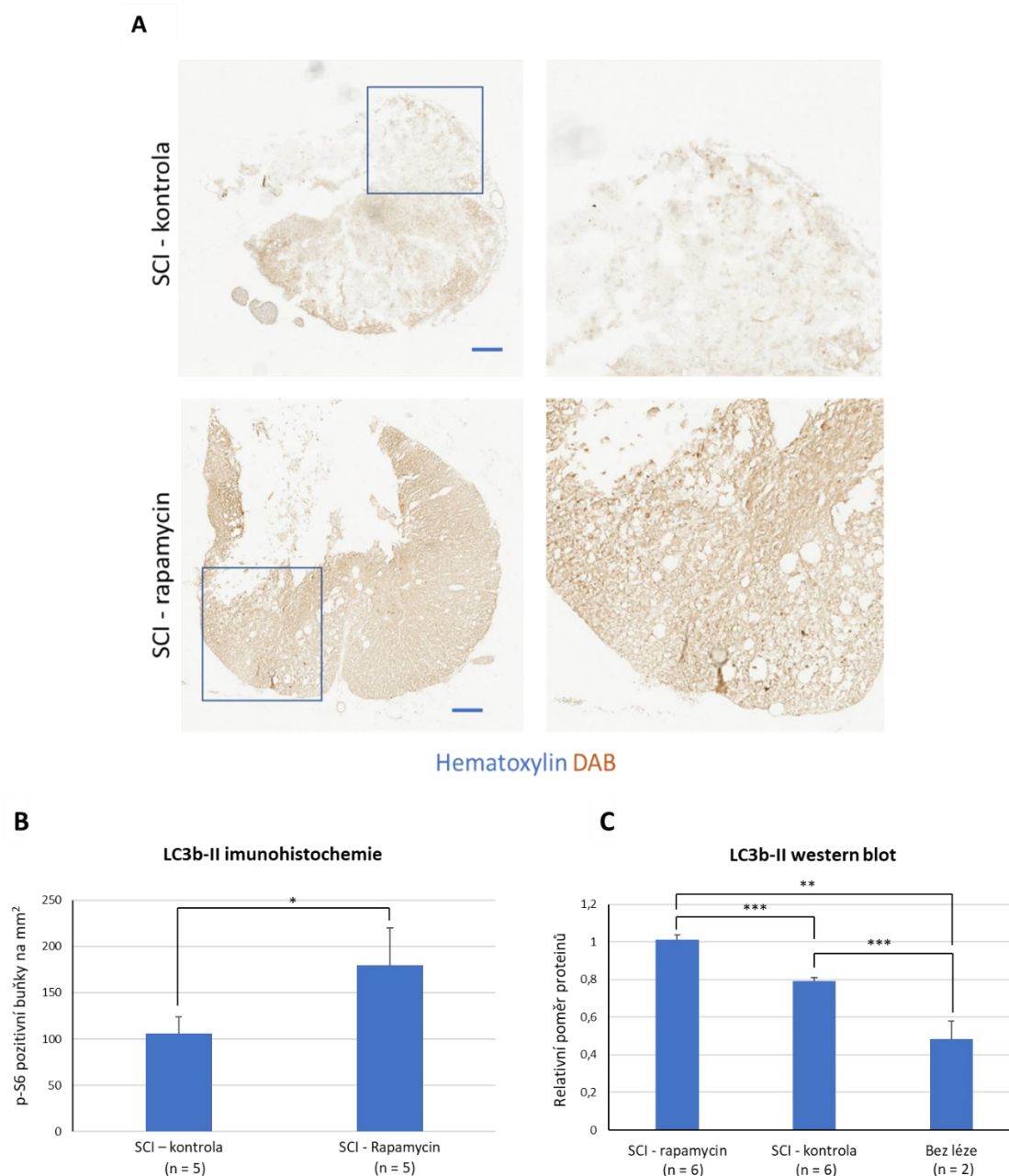
Pro studium účinku rapamycinu na míšní tkáň potkanů po SCI byla provedena imunohistochemická analýza, western blot a detekce přítomných cytokinů. Byl zkoumán vliv imunosupresiva na mTOR signální dráhu, autofagii a na produkci jednotlivých cytokinů.

Inhibiční vliv rapamycinu na mTOR byl ukázán na výsledcích imunohistochemické analýzy p-S6 (obr. 15A). Jedná se o fosforylovanou formu proteinu, který je cílem ribosomální kinázy S6K1. Ta je pod kontrolou mTORC1. p-S6 pozitivní buňky byly spočítány na transversálních řezech získaných z míchy potkanů, kteří byli usmrceni 7 dní po indukci léze (obr. 15B). Počet p-S6 pozitivních buněk byl vyšší u kontrolní skupiny zvířat než u skupiny, které byl podáván rapamycin ($p < 0,05$). Při analýze western blot (obr. 15C) byla pozorována signifikance mezi poměrem p-S6/S6 u skupin po míšním poranění a zdravou skupinou ($p < 0,05$), zatímco mezi kontrolní skupinou s míšní lézí a skupinou léčenou rapamycinem jsme pozorovali pouze trend v poklesu. Tvorba aktivovaného p-S6 byla potlačena účinkem rapamycinu.

V míšní tkáni byla zkoumána autofagie a její aktivace po SCI a po inhibici mTOR zprostředkované podáním rapamycinu. LC3b-II byl využit jako marker autofagie. Jeho hladiny byly měřeny metodami imunohistochemie a western blot. Analýza western blot (obr. 16C) ukázala v porovnání se zdravými kontrolami zvýšené hladiny markeru v obou skupinách zvířat po SCI ($p < 0,001$ a $p < 0,01$, respektive). Rozdíl byl detekován i mezi skupinou s rapamycinem a pouze po SCI ($p < 0,001$). U imunohistochemie (obr. 16A–B) byl pozorován zvýšený LC3b-II marker u zvířat, kterým byl podáván rapamycin, v porovnání s daty z kontrolní skupiny zvířat, kterým byl podáván solný roztok jako placebo ($p < 0,05$). Tyto výsledky potvrzují závěry z western blot. Autofagie po SCI byla zvýšena v míšní tkáni těch potkanů, kterým byl podáván rapamycin v porovnání s kontrolní skupinou.

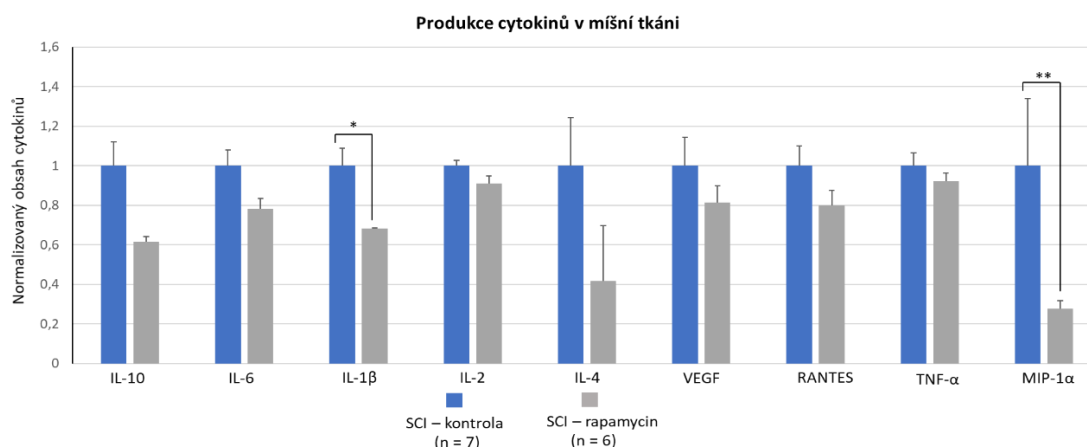


Obrázek 15: Vyhodnocení účinku rapamycinu na hladiny p-S6 po míšním poranění. Výsledky imunohistochemického barvení míšních řezů protilátkou proti fosforylovanému S6 ribosomálnímu proteinu (p-S6) a hematoxylinem (A). Nahoře vlevo je míšní řez kontrolní skupiny, vpravo potom modře ohraničený přibližný výřez. Dole vlevo je míšní řez ze skupiny, které byl podáván rapamycin, opět s přibližným výřezem. Řezy z potkanů, kterým byl podáván rapamycin, mají snížený počet p-S6 pozitivních buněk na řez v porovnání s kontrolní skupinou. (Měřítka 200 μ m.) Výsledky imunohistochemického barvení míšních řezů proti p-S6 ribosomálnímu proteinu a hematoxylinem byly kvantifikovány do grafů (B). Detekované množství p-S6 pozitivních buněk na mm² z několika řezů bylo zprůměrováno. Hodnoty pro kontrolní skupinu jsou mnohem větší než hodnoty pro skupinu ošetřenou rapamycinem. Byla provedena analýza metodou western blot (C). Porovnání skupin léčených rapamycinem, kontrolní skupiny s podaným placebem a skupiny bez indukovaného SCI. Míra fosforylace proteinů byla zjištěna porovnáním intenzit normalizovaných fosforylovaných a nefosforylovaných zón proteinů. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr \pm SEM; * $p < 0,05$.



Obrázek 16: Detekce hladin LC3b-II autofagického markeru v míše potkana po míšním poranění. Imunohistochemická analýza množství LC3b-II v řezech míšní tkáně (A). Nahoře jsou řezy z míšní tkáně kontrolní skupiny, dole skupina léčená rapamycinem. Vpravo jsou pak výřezy. Byly pozorovány zvýšené hodnoty LC3b-II u skupiny s rapamycinem. Hodnoty byly kvantifikovány v grafu (B). Celkové množství proteinu LC3b-II bylo stanoveno pomocí metody western blot (C). Hladiny LC3b-II byly vyšší u všech potkanů, kterým byla indukována míšní léze. U zvířat, kterým byl podáván rapamycin, byla detekována vyšší hladina markeru v porovnání s kontrolní skupinou. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Pro studium zánětlivé odpovědi byly měřeny hladiny cytokinů u potkanů po SCI. Byly měřeny hladiny cytokinů IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , MIP-1 α , VEGF a RANTES (obr. 17) v míšní tkáni.



Obrázek 17: Výsledky měření hladin produkovaných cytokinů v míšní tkáni. Hodnoty koncentrací jednotlivých cytokinů byly vypočítány s použitím kalibrační křivky získané měřením sedmi standardních koncentrací. Byla provedena normalizace vůči kontrole (100%). V grafu jsou modře vyobrazeny hodnoty získané z kontrolní skupiny, šedě je skupina, které byl podáván rapamycin. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Skupina zvířat které byl podáván rapamycin vykazovala statisticky nižší hladiny IL-1 β ($p < 0,05$) a MIP-1 α ($p < 0,001$) než skupina které byl podáván fyziologický roztok. Z těchto výsledků je zřejmé, že rapamycin ovlivnil produkci cytokinu v míšní tkáni po SCI. Potkani, kterým byl podán rapamycin, měli nižší hladiny cytokinů IL-6, IL-1 β a IL-2. Také u nich došlo ke snížení TNF- α a MIP-1 α .

6. Diskuse

mTOR kináza je součástí PI3K/Akt/mTOR signální dráhy (kap. 2.2.2., obr. 3) Vytváří dva strukturně a funkčně odlišné komplexy, mTORC1 a mTORC2, které se liší svojí citlivostí k rapamycinu (Saxton & Sabatini, 2017). Kináza je klíčová pro mnoho fyziologických i patologických procesů (Wullschleger et al., 2006). Podílí se na buněčném růstu, homeostáze a syntéze proteinů (Laplane & Sabatini, 2012). mTOR signalizace hraje důležitou roli v NSC a patologiích CNS (Licusi & Hartman, 2018), a to včetně SCI. Předchozí studie ukázaly, že inhibice rapamycinem v patologii SCI má protizánětlivé, neurogenerační a neuroprotektivní účinky a podporuje autofagii (H. C. Chen et al., 2013; Kanno et al., 2012; Y. Li et al., 2014; Sekiguchi et al., 2012; L. Zhang et al., 2014). Terapeutická transplantace NSC a jejich progenitorů má prokázaný pozitivní vliv na míšní tkáň po SCI. Podporuje regeneraci, dochází k nahrazování tkáně poškozené poraněním a utlumení zánětlivé odpovědi (Fischer et al., 2020; Karova et al., 2019; Kumamaru et al., 2018; Pereira et al., 2019; Ruzicka et al., 2017). Transplantace NSC a inhibice mTOR dráhy rapamycinem jsou tedy popsánymi přístupy v experimentální léčbě SCI. Jak bylo zmíněno v úvodu do problematiky (kap. 2.3.2.), přesná role mTOR dráhy v diferenciaci a proliferaci NSC nebyla dosud uspokojivě objasněna, a závěry publikovaných prací na toto téma se liší. Naším cílem bylo proto detailně prozkoumat, jaký vliv má podání rapamycinu na NSC kultury *in vitro* a na míšní tkáň experimentálních zvířat *in vivo*. Zkoumán byl vliv rapamycinu na mTOR signální dráhu, diferenciaci a proliferaci NSC, tok autofagie a na produkci cytokinů v zasažené tkáni.

Abychom zjistili vliv rapamycinu na mTOR kaskádu, provedli jsme analýzu aktivity mTOR kinázy pomocí metod western blot a imunocytochemie. Také jsme analyzovali expresi dalších členů mTOR signální dráhy, na kterých by se inhibice rapamycinem projevila, a to jak při diferenciaci, tak proliferaci NSC. Míru fosforylace proteinů jsme zjistili porovnáním intenzit normalizovaných zón odpovídajících fosforylovaným a nefosforylovaným proteinům.

mTORC1, komplex citlivý na inhibici rapamycinem, ovlivňuje syntézu proteinů fosforylací a inaktivací represoru translace 4E-BP1, a aktivační fosforylací S6 kinázy, která fosforyluje S6 protein. Z tohoto důvodu se fosforylace S6 a 4E-BP1 často využívá *in vivo* jako marker mTOR aktivity (Hay & Sonenberg, 2004). Zatímco se tedy množství

aktivních fosforylovaných forem proteinů mění podle aktivity dráhy, množství nefosforylovaných forem zůstává stejné. Inhibiční vliv rapamycinu na množství p-mTOR jsme pozorovali už v prvním týdnu diferenciaci (obr. 6). Naopak na množství p-4E-BP1/4E-BP1 při diferenciaci nemělo podání rapamycinu inhibiční vliv (obr. 7A). Míra fosforylace proteinu 4E-BP1 byla zvýšena u buněk, kterým byl podán rapamycin, v porovnání s kontrolní skupinou NSC. Hladiny p-S6/S6 byly sníženy po dvou týdnech diferenciaci u skupiny NSC, které byl podán rapamycin (obr. 7B). Při zkoumání vlivu rapamycinu na proliferaci jsme pozorovali, že u p-mTOR/mTOR docházelo ke statisticky významnému snížení hladin u buněk ošetřených rapamycinem vůči kontrole po celou dobu proliferace (obr. 12A), a ten samý výsledek jsme pozorovali u p-S6/S6 (obr. 12C). Hladiny p-4E-BP1/4E-BP1 (obr. 12D) byly zvýšeny. Na základě těchto výsledků je zřejmé, že rapamycin měl inhibiční vliv na mTOR a S6 při diferenciaci a proliferaci, ale neměl vliv na 4E-BP1. U tohoto proteinu docházelo naopak ke zvýšení míry fosforylace. Proč k tomuto efektu dochází není dosud zcela známo. Publikované práce na toto téma ukazují, že p-4E-BP1 může být vůči rapamycinové inhibici rezistentní (Feldman et al., 2009). Při zkoumání regenerace jater na potkaním modelu bylo pozorováno, že podáním rapamycinu došlo k inhibici aktivace S6K, ale ne k inhibici fosforylace 4E-BP1. Efekt rapamycinu na funkci 4E-BP1 je zřejmě velmi odlišný v kulturách buněk *in vitro* a *in vivo* (Jiang et al., 2001). Záleží také na tom, o jakou kulturu buněk se jedná (Choo et al., 2008). Bylo popsáno, že zatímco krátkodobá inhibice rapamycinem vedla k defosforylaci 4E-BP1 a jeho asociaci s eIF4E, dlouhodobá expozice po 24 a 48 hodin vedla k hyperfosforylaci a disociaci eIF4E. K této fosforylaci docházelo i navzdory stále probíhající inhibici mTORC1, což bylo dokázáno na výsledcích pro S6 kinázy. Ty byly inhibovány nepřetržitě 24 hodin po přidavku rapamycinu (Choo et al., 2008). Tyto závěry souhlasí s námi pozorovanými výsledky, kdy jsme popsali přetrvávající S6 inhibici a hyperfosforylaci 4E-BP1.

mTORC2 není citlivý na inhibici rapamycinem stejným způsobem jako mTORC1, spíše u něj dochází ke komplexnějšímu účinku při dlouhodobé inhibici (Haissaguerre et al., 2014). Narušení mTOR signalizace je pak zřejmě způsobeno vazbou rapamycinu na volný mTOR, který pak nemůže být začleněn do nových mTORC2 (Lamming et al., 2012). Při mTORC2 signalizaci musí také dojít k plné fosforylaci Akt (G. Yang et al., 2015). Analýza metodou western blot ukázala, že během prvních dvou dnů diferenciaci

došlo ke statisticky významnému zvýšení relativního poměru proteinů u buněk, kterým byl podán rapamycin, v porovnání s kontrolou (obr. 7C). V porovnání s těmito hodnotami byly hladiny detekované po dvou týdnech diferenciaci sníženy jak u buněk kontroly, tak u buněk, kterým byl podáván rapamycin. Hladiny p-Akt/Akt byly zvýšeny u buněk ošetřených rapamycinem i při proliferačním experimentu (obr. 12B). Tyto závěry souhlasí s publikovanými výsledky v literatuře. Inhibice mTOR signalizace přes mTORC1/S6K spustí smyčku negativní zpětné vazby, což vede k aktivaci Akt signalizace (Wan et al., 2007).

Jak se z NSC v průběhu diferenciaci stávají různé buněčné typy neurální linie, dochází také ke změně v expresi jejich markerů. Detekcí těchto markerů lze potom určit, zda probíhá diferenciaci do gliálního, nebo do neurálního fenotypu. Abychom zjistili vliv rapamycinu na NSC, provedli jsme pomocí western blot a imunocytochemického barvení analýzu exprese typických markerů pro proliferaci a pro diferenciaci jak do gliálního, tak do neurálního fenotypu. Typickým markerem astrocytů jsou GFAP a vimentin. Zatímco v raných fázích maturace exprimují radiální glie a astrocyty především vimentin, postupně dochází k jeho nahrazení GFAP. Jedná se o nejhojněji zastoupený cytoskeletální intermediární filament v dospělém astrocytu a využívá se jako marker diferenciaci NSC do tohoto buněčného typu (Bramanti et al., 2010). Ke zvýšení jeho exprese v astrocytech dochází při patologiích (Hol & Pekny, 2015). Během diferenciaci došlo po 24 hodinách od přidavku rapamycinu snížení tohoto markeru u NSC, kterým byl podán rapamycin, v porovnání s kontrolní skupinou. Po dvou týdnech diferenciaci nebyly GFAP pozitivní buňky už téměř v kultuře přítomny (obr. 8). Transkripční faktor NeuN je exprimován v jádře a v cytoplasmě post-mitotických neuronů centrálního i periferního nervového systému. Jeho exprese koreluje s terminální diferenciací do neuronů (K. K. Kim et al., 2009; Mullen et al., 1992). Na výsledcích z analýzy western blot jsme pozorovali, že relativní hladina tohoto proteinu byla po přidavku rapamycinu nízká. Stejně tak tomu bylo u kontrolní skupiny. Po dvou týdnech diferenciaci jsme pozorovali růst markeru jak u kontrolní skupiny, tak u buněk ošetřených rapamycinem. Tato data se shodovala s výsledky imunocytochemického barvení (obr. 9A–B). MAP2 je protein, který je specifický pro cytoskelet neuronů. Podílí se na výstavbě cytoskeletu a využívá se jako marker neurálního fenotypu. V progenitorech je jeho exprese slabá, k jejímu nárůstu dojde až po expresi β 3-tubulinu, který je rovněž specifický pro neurony (Dehmelt &

Halpain, 2005) a využívá se jako neurální marker (Von Bohlen Und Halbach, 2011). Přítomnost MAP2 a β 3-tubulinu je ukazatelem toho, že proběhla neurální diferenciace (C. Liu et al., 2013; Piper et al., 2001). MAP2 pozitivní buňky jsme v kultuře NSC detekovali v druhém týdnu diferenciace (obr. 10). Naše analýza β 3-tubulinu metodou western blot ukázala, že růst hladin tohoto markeru kopíroval data získaná pro NeuN a MAP2 (obr. 11C). Docházelo k jeho zvýšení po dvou týdnech diferenciace. Dalším typickým neurálním markerem, který jsme detekovali, byl neurofilament H. Neurofilamenta mají tři podjednotky o různé molekulové hmotnosti a jsou součástí intermediárních filament cytoskeletu dospělého neuronu (Al-Chalabi & Miller, 2003). Analýza western blot ukázala, že hladina NF-H rostla po dvou týdnech diferenciace (obr. 11A–B).

Na základě těchto výsledků jsme dospěli k závěru, že se signální dráha mTOR podílí na diferenciaci jak do gliálního, tak do neurálního fenotypu. Zablokování dráhy rapamycinem výrazně snížilo diferenciaci do glií a částečně do neurálního fenotypu. Zejména pak prodloužená aplikace rapamycinu po dobu 48 hodin ovlivnila výsledky neurální diferenciace více, než tomu bylo v případě 24 hodinové aplikace, jak je vidět na výsledcích z analýzy MAP2 (obr. 10), NF-H (obr. 11A–B) a β 3-tubulinu (obr. 11C).

Pro zjištění vlivu rapamycinu na proliferaci NSC jsme detekovali přítomnost typických markerů pomocí imunocytochemického barvení a metody western blot. Sox2 je jaderný transkripční faktor, který je důležitý pro pluripotenci a sebeobnovu NSC (Rizzino, 2009). Je typickým markerem proliferujících NSC a neurálních progenitorů. S maturací a diferenciací do různých buněčných typů neurální linie hladina jeho exprese postupně klesá a v post-mitotických neuronech už není přítomen (Ellis et al., 2004). Při zkoumání vlivu rapamycinu na proliferaci jsme u Sox2 nepozorovali, že by tento marker byl podáním rapamycinu významně ovlivněn (obr. 13). Další marker, který jsme detekovali, byl Ki-67. Jedná se o jaderný protein, který se využívá jako marker dělících se buněk. Je přítomen ve všech fázích buněčného cyklu kromě G_0 a rané G_1 fáze (Zacchetti et al., 2003). Výsledky imunocytochemického barvení a jeho kvantifikace ukazují, že rapamycin snížil hladiny Ki-67 u proliferujících buněk v porovnání s kontrolní skupinou. Statisticky významné snížení jsme pozorovali po 6 hodinách proliferace (obr. 14). Nanog je transkripční faktor exprimovaný vnitřní masou buněk neboli embryoblastem, embryonálními a zárodečnými kmenovými buňkami. Patří spolu

se Sox2 mezi klíčové transkripční faktory, které zodpovídají za kmenovost těchto buněk. Nanog hraje důležitou roli v sebeobnově neurálních kmenových buněk a má vliv na jejich proliferaci (Garg et al., 2013). Také má vliv na vstup do S fáze buněčného cyklu u embryonálních kmenových buněk (Xin Zhang et al., 2009). Hladina exprese Nanog se mění v průběhu buněčného cyklu a nejvyšší je během G₁ fáze. Také je ovlivněna přítomností jeho pozitivních a negativních regulátorů (Zaveri & Dhawan, 2018). Po přidání rapamycinu k NSC při proliferačním experimentu jsme pozorovali statisticky významné snížení hladin exprese tohoto markeru v porovnání s kontrolní skupinou buněk po 1, 2 i 6 hodinách proliferace (obr. 12E). Důvodem růstu hladiny Nanog v průběhu experimentu mohl být průchod buněčným cyklem, během kterého dochází k růstu exprese tohoto markeru před vstupem do S fáze. Časový rozsah proliferačního experimentu ale nebyl dostatečný k tomu, abychom získali dostatek dat pro podložení této domněnky. Transkripční faktor Pax6 je klíčový ve vývojových procesech CNS. Je exprimován v NSC a neurálních progenitorech od počátečních fází vývoje CNS a v dospělosti v SGZ a SVZ, kde dochází k neurogenezi v dospělém mozku (Osumi et al., 2008). Pax6 se podílí na regulaci proliferace, diferenciaci a sebeobnovy NSC. Nadměrná exprese Pax6 v progenitorech indukuje neurální diferenciaci a je považován za hlavní determinační faktor, který reguluje rovnováhu mezi neurogenezí a tvorbou astrocytů a oligodendrocytů (Curto et al., 2014; Gómez-López et al., 2011; Sakurai & Osumi, 2008). Analýzou markeru metodou western blot jsme zjistili, že hladiny Pax6 v průběhu proliferace NSC klesaly v kontrolní skupině i u buněk, kterým byl podán rapamycin (obr. 10F). U buněk s rapamycinem byl tento pokles oproti kontrolní skupině větší, a to především po dvou hodinách proliferace. Výsledky proliferačního experimentu naznačují, že podíl mTOR dráhy na proliferaci NSC je menší, než je tomu u diferenciaci. S přihlédnutím k výsledkům z diferenciačního a proliferačního experimentu jsme toho názoru, že v případě aplikace kombinované terapie rapamycinu s transplantací NSC je třeba vzít v potaz, že dlouhodobé podávání rapamycinu by mohlo snížit diferenciační potenciál NSC. K tomu by došlo v případě, že by byla transplantace buněk provedena před nebo souběžně s podáváním rapamycinu. Buněčná terapie pomocí transplantace NSC by tedy musela následovat až po aplikaci rapamycinu.

p-S6 je fosforylovaná forma S6 ribosomálního proteinu, který je součástí 40s ribosomální podjednotky a podílí se na translaci. S6 protein má serinové zbytky, které

mohou být fosforylovány ribosomálními kinázami S6K1 a S6K2. Aktivita těchto kináz podléhá regulaci mTOR signální dráhy, konkrétně komplexu mTORC1 (Hay & Sonenberg, 2004; Holz et al., 2005). Abychom zjistili vliv rapamycinu na mTOR dráhu po SCI, provedli jsme analýzu exprese p-S6 v tkáni potkanů, kterým byla indukována míšní léze (obr. 15). Míra fosforylace proteinů byla zjištěna porovnáním intenzit normalizovaných zón odpovídajících fosforylovaným a nefosforylovaným proteinům. Výsledky imunohistochemické analýzy a western blot ukazují, že došlo ke snížení hodnot p-S6 ve tkáni po SCI u potkanů, kterým byl podáván rapamycin. Počet p-S6 pozitivních buněk byl vyšší u kontrolní skupiny než u skupiny s rapamycinem. Podání rapamycinu blokovalo mTOR signální dráhu, a tím i produkci p-S6.

Imunohistochemická analýza tkáně ukázala, že pozorované rozdíly v expresi p-S6 mezi zvířaty, kterým byl podáván rapamycin, a těmi, které dostávaly placebo, byly pozorovatelné jen 4 mm od středu léze. Existuje tedy možnost, že naše výsledky z western blot nejsou úplně reprezentativní co se změn v expresi proteinů týče, protože vzorky proteinů obsahovaly také proteiny z okolí epicentra léze. I přes to můžeme říct, že po podání rapamycinu došlo k inhibici mTOR signální dráhy v míšní tkáni potkanů po SCI.

Průběh SCI je velice komplexní, probíhá na mnoha úrovních a zahrnuje mnoho procesů (kap. 2. 1. 3., obr. 1). Jeho následkem dochází k narušení fyziologických dějů buňky, což ještě více prohlubuje destrukci tkáně. Jedním ze zasažených procesů je i autofagie. Při SCI dochází ke zvýšení exprese jejích markerů. Mezi ně patří LC3 proteiny, které lze nalézt na povrchu membrán pre-autofagických a autofagických vakuol. Podílí se na tvorbě autofagozomu (Kabeya et al., 2000). Existují tři izoformy LC3 – A, B a C. Ty se liší tkáněmi, ve kterých jsou exprimovány, a svými post-translačními modifikacemi (He et al., 2003). V průběhu patologie sekundárního poranění byla kromě exprese apoptotických markerů pozorována také akumulace autofagozomů, a to jak v experimentálních modelech SCI (Kanno et al., 2011; S. Liu et al., 2015; Ray, 2020), tak ve tkáni odebrané od pacientů (Sakai et al., 2014). Jak bylo popsáno (kap. 2.1.6.), autofagie má neuroprotektivní účinky v patologii sekundárního poranění (Ray, 2020; L. Zhang et al., 2014; K. Zhou et al., 2017). Narušení jejího toku po SCI jde ruku v ruce s buněčným stresem a indukuje apoptózu motorických neuronů (S. Liu et al., 2015). Důležitý v procesu autofagie je mTOR, který funguje jako její regulátor (Jung et al., 2010; Rabanal-Ruiz et al., 2017). Předchozími výzkumy bylo prokázáno, že inhibice mTOR

signalizace rapamycinem v modelu akutního traumatického SCI podpořila průběh autofagie u potkanů (Z. Y. Wang et al., 2014) a myši (Sekiguchi et al., 2012). Byly detekovány zvýšené hladiny markerů autofagie Beclinu-1 a LC3b-II a snížená apoptóza neuronů. Regenerace motorických funkcí byla zvýšena. Také byl pozorován zvýšený tok autofagie a potlačení zánětu, aktivace mikroglíí a infiltrování tkáně makrofágy a neutrofily (Goldshmit et al., 2015). Inhibice pomocí rapamycinu má pozitivní vliv na SCI, podporuje autofagii a má protizánětlivý a neuroprotektivní účinek (H. C. Chen et al., 2013). V naší práci byly detekovány hladiny LC3b-II v míšní tkáni experimentálních zvířat po SCI (obr. 16). Hladiny markeru v míšních řezech potkanů byly po SCI zvýšeny u obou skupin v porovnání se zdravými zvířaty. U potkanů, kterým byl podán rapamycin, jsme ale pozorovali vyšší hladiny markeru než u kontrolní skupiny, které bylo podáváno placebo. Z toho lze vyvodit závěr v souladu s publikovanou a výše citovanou literaturou, že mTOR inhibice rapamycinem podporuje při SCI tok autofagie.

V průběhu SCI dochází k aktivaci astrocytů a mikroglíí, které spolu s buňkami imunitního systému produkují prozánětlivé cytokiny IL-1 β , IL-6, a TNF- α . K jejich expresi dochází již krátce po poranění (L. Yang et al., 2004) a svým účinkem přispívají k zánětlivé reakci a dalšímu poškození tkáně (Garcia et al., 2016; Oyinbo, 2011). Při podávání imunosupresiv jako jsou kurkumin (Ni et al., 2015) a rapamycin (X. G. Li et al., 2019) byl popsán vliv na mechanismy zánětlivé odpovědi a na hladiny prozánětlivých cytokinů. Pro zjištění vlivu rapamycinu na produkci cytokinů v míšní tkáni potkanů po SCI jsme provedli měření hladin cytokinů obsažených v médiu, ve kterém byla inkubována míšní tkáň (obr. 17). Získané hodnoty pro tkáň potkanů, kterým byl podáván rapamycin a kterým bylo podáváno placebo pak byly porovnány.

IL-1 β je prozánětlivý cytokin, jehož hladina roste po SCI (C. X. Wang et al., 1997). Bylo popsáno, že podání rapamycinu po SCI vedlo ke snížení hladin prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β (Song et al., 2015). Absence prozánětlivého IL-1 β po SCI má pozitivní vliv na osud nervové tkáně (Boato et al., 2013). U IL-1 β jsme pozorovali statisticky významné snížení ve skupině s rapamycin oproti kontrole s placebem. Snížení produkce tohoto typicky prozánětlivého cytokinu stejně jako snížení u IL-6 podporuje tvrzení, že rapamycin má v prostředí SCI protizánětlivý vliv.

TNF- α je prozánětlivý cytokin, který svým účinkem způsobuje po SCI excitotoxicitu, indukuje expresi adhezivních molekul a chemokiny. Velmi přispívá k rozvoji zánětlivých

dějů a destrukci tkáně po SCI (Garcia et al., 2016). V akutní fázi má TNF- α prozánětlivé účinky, s přechodem do chronické fáze SCI byl ovšem pozorován pozitivní vliv na remodelaci tkáně a sekrece růstových faktorů. TNF- α má tedy zřejmě v SCI dvojitou úlohu. Zatímco v akutní fázi je jeho vliv negativní, v chronické fázi poranění jsou jeho účinky vesměs pozitivní (Chi et al., 2008). V kontextu patologie míšního poranění byl popsán pozitivní vliv TNF- α antagonistů při transplantaci NSC po SCI (Le et al., 2014) a snížení hladiny TNF- α po podání rapamycinu (H. C. Chen et al., 2013). Při porovnání jeho exprese jsme pozorovali snížení u skupiny ošetřené rapamycinem, ovšem menší, než tomu bylo u ostatních prozánětlivých cytokinů, IL-6 a IL-1 β .

Dalším prozánětlivým cytokinem je IL-6, který má zřejmě podobně jako TNF- α v patologii CNS duální funkci. Podporuje aktivaci a migraci makrofágů a mikroglíí do zasažené tkáně (Hurst et al., 2001) a zvyšuje zánět. Jeho vysoké hladiny mohou vést k tomu, že NSC budou namísto do neuronů diferencovat do astrocytů, čímž je podporována tvorba gliové jizvy (Mukaino et al., 2008). Inhibice IL-6 signalizace pomocí neutralizačních protilátek byla popsána jako možný terapeutický přístup při léčbě SCI (Guptarak et al., 2013; Mukaino et al., 2010; Nakamura et al., 2005), a jeho blokáde snižovala zánět (Arima et al., 2014). Na druhou stranu bylo popsáno, že IL-6 inhibuje kanály pro sodné ionty v neuronech, což by mohlo mít pozitivní účinek proti excitotoxicitě (X. Li et al., 2014). Hladiny exprese IL-6 u skupiny s rapamycinem byly statisticky nevýznamně sníženy oproti skupině, které bylo podáváno placebo. Následkem inhibice rapamycinem došlo v míšní tkáni ke snížení exprese IL-6.

MIP-1 α se podílí na dalším poškození tkáně po SCI, hraje roli ve fagocytóze myelinu, a využívá se jako spolehlivý marker zánětu (Ousman & David, 2001). Jeho absence má pozitivní vliv na zotavení a dochází ke snížení poškození neurální tkáně (Pelisch et al., 2020). Při detekci tohoto cytokinu u kontrolní skupiny a skupiny s rapamycinem jsme zaznamenali výrazný pokles v jeho hladině.

SCI je provázáno tvorbou edému a zvýšením permeability cév. Tyto děje jsou pravděpodobně zprostředkovány VEGF a tyrosin proteinkinázou, jejíž aktivita je pod vlivem VEGF regulace (Akiyama et al., 2003). VEGF se v patologii SCI podílí na mnoha dějích. Bylo popsáno, že podávání VEGF vedlo ke zvýšení permeability BSCB v akutní nebo sub-akutní fázi SCI, a tento efekt může i přetrvávat do chronické fáze. Na druhou stranu je VEGF spojován s angiogenezí, neurogenezí a zlepšením

pohyblivosti. Za tyto poněkud protichůdné role VEGF v SCI zřejmě může jeho regulátor, hypoxií indukovatelný faktor 1 (HIF-1) (Long et al., 2015). RANTES je chemokin, který indukuje aktivaci a migraci leukocytů (Appay & Rowland-Jones, 2001). Snížení hladiny RANTES pomocí kurkuminu má neuroprotektivní účinek a snižuje míru buněčné smrti (M. S. Lin et al., 2011). U RANTES jsme detekovali jsme podobné snížení hladiny u skupiny ošetřené rapamycinem vůči skupině s placebem jako v případě VEGF. Toto snížení nebylo statisticky významné.

Interleukin IL-10 je typickým protizánětlivým cytokinem. Poskytuje trofickou podporu neuronům a má neuroprotektivní účinek v SCI. Jeho vlivem dochází ke snížení exprese prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6, TNF- α , mediátorů zánětu a proapoptotických faktorů. Exprese antiapoptotických faktorů je naopak zvýšena. Receptor IL-10 je exprimován na buňkách nervového systému, jako jsou například astrocyty a mikroglie. Zde působí coby antagonist produkce prozánětlivých cytokinů. Terapeutická aplikace IL-10 po SCI byla popsána i v kombinaci s buněčnou transplantací (Thompson et al., 2013; Z. Zhou et al., 2009). V našich výsledcích jsme pozorovali statisticky nevýznamnou sníženou hladinu exprese IL-10 v míšní tkáni potkanů, kterým byl podáván rapamycin. Vzhledem k tomu, že rapamycin i IL-10 by měly mít na míšní tkáň po SCI pozitivní účinek, není důvod snížené hladiny IL-10 oproti kontrole zcela jasný. Tento výsledek bude vyžadovat další studium.

V případě IL-4 byl prokázán podobný neuroprotektivní účinek při SCI jako u IL-10 (Z. Zhou et al., 2009). Tento interleukin podporuje diferenciaci makrofágů do hojivého M2 fenotypu (Francos-Quijorna et al., 2016) a také reguluje rozsah aktivace makrofágů v akutní fázi SCI. Makrofágy stimulované IL-4 jsou méně neurotoxické a mají zvýšený regenerační účinek. Injekční podání IL-4 se dá využít pro terapii (S. I. Lee et al., 2010). V našem případě bylo pozorováno statisticky nevýznamné snížení exprese IL-4 u skupiny, které byl podáván rapamycin.

IL-2 je prozánětlivý cytokin, který je produkován především aktivovanými CD4⁺ T buňkami. Je důležitý pro vývoj T lymfocytů a regulaci autoimunity díky svému vlivu na regulační T lymfocyty. Při indukci SCI u potkana bylo popsáno, že hladiny IL-2 byly významně sníženy oproti zdravým kontrolám (Mukhamedshina et al., 2017). Receptor IL-2, IL-2R, je také klíčový pro správné načasování a sílu imunitní odpovědi. Interakce mezi IL-2 a jeho receptorem po SCI přispívá k proliferaci T pomocných lymfocytů, má

vliv na cytotoxické T lymfocyty, B buňky a NK (z anglického natural killers) buňky (Hellenbrand et al., 2021). Role regulačních a efektorových T lymfocytů není v patologii CNS ještě úplně objasněna, neboť předchozí práce dospěly k rozdílným závěrům, co se protektivního a destruktivního vlivu těchto T buněčných populací týče (Walsh et al., 2014). Námi provedená analýza exprese IL-2 po SCI ukázala malé snížení jeho hladiny u zvířat ošetřených rapamycinem.

Analýzou produkce cytokinů v poškozené míšní tkáni po SCI jsme zjistili, že rapamycin měl vliv na jejich hladiny. Došlo ke signifikantnímu snížení exprese prozánětlivých cytokinů MIP-1 α a IL-1 β , změny ostatních hladin nebyly statisticky významné.

7. Závěr

Na základě výše popsaných výsledků a získaných dat můžeme říct, že došlo k inhibici mTOR dráhy v NSC rapamycinem. Zajímavým výsledkem byla hyperfosforylace 4E-BP1, kterou jsme pozorovali jak v krátkodobých proliferačních experimentech, tak v dlouhodobých diferenciačních experimentech. Tento výsledek bude vyžadovat další zkoumání. Vliv mTOR signální dráhy na diferenciaci NSC je větší než na proliferaci. Prodloužená expozice rapamycinu vedla ke snížení exprese zralých neurálních markerů. Ze získaných dat jsme došli k závěru, že dlouhodobá aplikace rapamycinu by mohla vést ke snížení diferenciačního potenciálu NSC. Na to by bylo třeba brát ohled v případě kombinované terapie rapamycinu s transplantací NSC.

Dále jsme popsali vliv rapamycinu na míšní poranění *in vivo*. V potkaním modelu SCI rapamycin inhiboval mTOR dráhu, což se projevilo sníženou expresí p-S6. Potvrdili jsme pozitivní vliv rapamycinu na tok autofagie po SCI pomocí analýzy exprese markeru LC3b-II. Rapamycin moduloval produkci cytokinů v tkáni po indukci SCI. Bylo pozorováno významné snížení hladin prozánětlivých cytokinů MIP-1 α a IL-1 β .

Seznam použité literatury

- Abraham, R. T., & Wiederrecht, G. J. (1996). Immunopharmacology of rapamycin. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 14, pp. 483–510). Annu Rev Immunol.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.483>
- Ahuja, C. S., & Fehlings, M. (2016). Concise Review: Bridging the Gap: Novel Neuroregenerative and Neuroprotective Strategies in Spinal Cord Injury. *STEM CELLS Translational Medicine*, 5(7), 914–924. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0381>
- Ahuja, C. S., Martin, A. R., & Fehlings, M. (2016). Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma [version 1; referees: 2 approved]. In *F1000Research* (Vol. 5). Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7586.1>
- Ahuja, C. S., Nori, S., Tetreault, L., Wilson, J., Kwon, B., Harrop, J., Choi, D., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic spinal cord injury - Repair and regeneration. *Clinical Neurosurgery*, 80(3), S22–S90. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyw080>
- Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M. R. N., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic spinal cord injury. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.18>
- Akiyama, C., Yuguchi, T., Nishio, M., Fujinaka, T., Taniguchi, M., Nakajima, Y., & Yoshimine, T. (2003). Src family kinase inhibitor PP1 improves motor function by reducing edema after spinal cord contusion in rats. *Acta Neurochirurgica, Supplementum*, 86(86), 421–423. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0651-8_87
- Al-Chalabi, A., & Miller, C. C. J. (2003). Neurofilaments and neurological disease. In *BioEssays* (Vol. 25, Issue 4, pp. 346–355). Bioessays. <https://doi.org/10.1002/bies.10251>
- Alessi, D., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N., & Avruch, J. (1998). 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Current Biology*, 8(2), 69–81. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70037-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70037-5)
- Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2015). Myelin damage and repair in pathologic CNS: Challenges and prospects. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 8, Issue JULY, p. 35). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00035>
- Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic spinal cord injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. *Frontiers in Neurology*, 10, 282. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>
- Allen, A. R. (1911). Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: A preliminary report. *Journal of the American*

- Medical Association, LVII*(11), 878–880.
<https://doi.org/10.1001/jama.1911.04260090100008>
- Amemori, T., Ruzicka, J., Romanyuk, N., Jhanwar-Uniyal, M., Sykova, E., & Jendelova, P. (2015). Comparison of intraspinal and intrathecal implantation of induced pluripotent stem cell-derived neural precursors for the treatment of spinal cord injury in rats. *Stem Cell Research and Therapy, 6*(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0255-2>
- Amo-Aparicio, J., Martínez-Muriana, A., Sánchez-Fernández, A., & López-Vales, R. (2018). Neuroinflammation Quantification for Spinal Cord Injury. *Current Protocols in Immunology, 123*(1). <https://doi.org/10.1002/cpim.57>
- Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B. S., Deming, T. J., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature, 532*(7598), 195–200.
<https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Andreotti, J. P., Silva, W. N., Costa, A. C., Picoli, C. C., Bitencourt, F. C. O., Coimbra-Campos, L. M. C., Resende, R. R., Magno, L. A. V., Romano-Silva, M. A., Mintz, A., & Birbrair, A. (2019). Neural stem cell niche heterogeneity. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 95, pp. 42–53). NIH Public Access.
<https://doi.org/10.1016/j.semdb.2019.01.005>
- Appay, V., & Rowland-Jones, S. L. (2001). RANTES: A versatile and controversial chemokine. In *Trends in Immunology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 83–87). Trends Immunol.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(00\)01812-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(00)01812-3)
- Arima, H., Hanada, M., Hayasaka, T., Masaki, N., Omura, T., Xu, D., Hasegawa, T., Togawa, D., Yamato, Y., Kobayashi, S., Yasuda, T., Matsuyama, Y., & Setou, M. (2014). Blockade of IL-6 signaling by MR16-1 inhibits reduction of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in a mouse model of spinal cord injury. *Neuroscience, 269*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.03.012>
- Azbill, R. D., Mu, X., & Springer, J. E. (2000). Riluzole increases high-affinity glutamate uptake in rat spinal cord synaptosomes. *Brain Research, 871*(2), 175–180.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02430-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02430-6)
- Batchelor, P. E., Wills, T. E., Skeers, P., Battistuzzo, C. R., Macleod, M. R., Howells, D. W., & Sena, E. S. (2013). Meta-Analysis of Pre-Clinical Studies of Early Decompression in Acute Spinal Cord Injury: A Battle of Time and Pressure. *PLoS ONE, 8*(8), e72659.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072659>
- Beattie, R., & Hippenmeyer, S. (2017). Mechanisms of radial glia progenitor cell lineage progression. In *FEBS Letters* (Vol. 591, Issue 24, pp. 3993–4008). Wiley Blackwell.

- <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12906>
- Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S. J. H., Asara, J. M., & Manning, B. D. (2016). mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*, 351(6274), 728–733. <https://doi.org/10.1126/science.aad0489>
- Boato, F., Rosenberger, K., Nelissen, S., Geboes, L., Peters, E. M., Nitsch, R., & Hendrix, S. (2013). Absence of IL-1 β positively affects neurological outcome, lesion development and axonal plasticity after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-6>
- Bracken, M. B. (2012). Steroids for acute spinal cord injury. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1(1). <https://doi.org/10.1002/14651858.cd001046.pub2>
- Bramanti, V., Tomassoni, D., Avitabile, M., Amenta, F., & Avola, R. (2010). Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, 2 S(2), 558–570. <https://doi.org/10.2741/s85>
- Brunn, G. J., Hudson, C. C., Sekulić, A., Williams, J. M., Hosoi, H., Houghton, P. J., Lawrence, J. C., & Abraham, R. T. (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*, 277(5322), 99–101. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.99>
- Burnside, E. R., & Bradbury, E. J. (2014). Review: Manipulating the extracellular matrix and its role in brain and spinal cord plasticity and repair. In *Neuropathology and Applied Neurobiology* (Vol. 40, Issue 1, pp. 26–59). Neuropathol Appl Neurobiol. <https://doi.org/10.1111/nan.12114>
- Chen, H. C., Fong, T. H., Hsu, P. W., & Chiu, W. T. (2013). Multifaceted effects of rapamycin on functional recovery after spinal cord injury in rats through autophagy promotion, anti-inflammation, and neuroprotection. *Journal of Surgical Research*, 179(1). <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.02.023>
- Chen, K. B., Uchida, K., Nakajima, H., Yayama, T., Hirai, T., Watanabe, S., Guerrero, A. R., Kobayashi, S., Ma, W. Y., Liu, S. Y., & Baba, H. (2011). Tumor necrosis factor- α antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. *Spine*, 36(17), 1350–1358. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181f014ec>
- Cheng, Z., Zhu, W., Cao, K., Wu, F., Li, J., Wang, G., Li, H., Lu, M., Ren, Y., & He, X. (2016). Anti-inflammatory mechanism of neural stem cell transplantation in spinal cord injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091380>
- Cheriyian, T., Ryan, D. J., Weinreb, J. H., Cheriyian, J., Paul, J. C., Lafage, V., Kirsch, T., & Errico, T. J. (2014). Spinal cord injury models: A review. In *Spinal Cord* (Vol. 52, Issue 8, pp. 588–595). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sc.2014.91>

- Chi, L. Y., Yu, J., Zhu, H., Li, X. G., Zhu, S. G., & Kindy, M. S. (2008). The dual role of tumor necrosis factor- α in the pathophysiology of spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 438(2), 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.04.043>
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 37, Issue 5 SPEC. ISS., pp. 942–946). Int J Biochem Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>
- Choo, A. Y., Yoon, S. O., Sang, G. K., Roux, P. P., & Blenis, J. (2008). Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17414–17419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809136105>
- Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R., & Blenis, J. (1992). Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell*, 69(7), 1227–1236. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90643-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90643-Q)
- Cofano, F., Boido, M., Monticelli, M., Zenga, F., Ducati, A., Vercelli, A., & Garbossa, D. (2019). Mesenchymal stem cells for spinal cord injury: Current options limitations, and future of cell therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20112698>
- Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. In *Trends in Immunology* (Vol. 37, Issue 9, pp. 608–620). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.006>
- Cordaro, M., Paterniti, I., Siracusa, R., Impellizzeri, D., Esposito, E., & Cuzzocrea, S. (2017). KU0063794, a Dual mTORC1 and mTORC2 Inhibitor, Reduces Neural Tissue Damage and Locomotor Impairment After Spinal Cord Injury in Mice. *Molecular Neurobiology*, 54(4), 2415–2427. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9827-0>
- Couillard-Despres, S., Bieler, L., & Vogl, M. (2017). Pathophysiology of traumatic spinal cord injury. In *Neurological Aspects of Spinal Cord Injury* (pp. 503–528). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46293-6_19
- Cregg, J. M., DePaul, M. A., Filous, A. R., Lang, B. T., Tran, A., & Silver, J. (2014). Functional regeneration beyond the glial scar. In *Experimental Neurology* (Vol. 253, pp. 197–207). Exp Neurol. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.12.024>
- Crowe, M. J., Bresnahan, J. C., Shuman, S. L., Masters, J. N., & Beattie, M. S. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature Medicine*, 3(1), 73–76. <https://doi.org/10.1038/nm0197-73>
- Curto, G. G., Nieto-Estévez, V., Hurtado-Chong, A., Valero, J., Gómez, C., Alonso, J. R., Weruaga, E., & Vicario-Abejón, C. (2014). Pax6 Is essential for the maintenance and

- multi-lineage differentiation of neural stem cells, and for neuronal incorporation into the adult olfactory bulb. *Stem Cells and Development*, 23(23), 2813–2830.
<https://doi.org/10.1089/scd.2014.0058>
- David, S., & Kroner, A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 12, Issue 7, pp. 388–399). Nat Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1038/nrn3053>
- Dehmelt, L., & Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. In *Genome Biology* (Vol. 6, Issue 1). Genome Biol. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-6-1-204>
- Dibble, C. C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J. M., Finan, P. M., Kwiatkowski, D. J., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2012). TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Molecular Cell*, 47(4), 535–546.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.009>
- Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 6, pp. 349–364). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
- Donnelly, D. J., & Popovich, P. G. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. In *Experimental Neurology* (Vol. 209, Issue 2, pp. 378–388). Exp Neurol.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.009>
- Dos, D. S., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology*, 14(14), 1296–1302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054>
- Dumont, C. M., Margul, D. J., & Shea, L. D. (2016). Tissue Engineering Approaches to Modulate the Inflammatory Milieu following Spinal Cord Injury. In *Cells Tissues Organs* (Vol. 202, Issues 1–2, pp. 52–66). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000446646>
- Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., Hurlbert, R. J., Boulos, P. T., Ellegala, D. B., & Dumont, A. S. (2001). Acute spinal cord injury, part I: Pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology*, 24(5), 254–264. <https://doi.org/10.1097/00002826-200109000-00002>
- Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M. G., MacKeigan, J. P., Finan, P. M., Clish, C. B., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular Cell*, 39(2), 171–183.

- <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>
- Dyck, S., Kataria, H., Alizadeh, A., Santhosh, K. T., Lang, B., Silver, J., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2018). Perturbing chondroitin sulfate proteoglycan signaling through LAR and PTP σ receptors promotes a beneficial inflammatory response following spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1128-2>
- Ellis, P., Fagan, B. M., Magness, S. T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M., & Pevny, L. (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Developmental Neuroscience*, 26(2–4), 148–165. <https://doi.org/10.1159/000082134>
- Emerit, J., Beaumont, C., & Trivin, F. (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 55, Issue 6, pp. 333–339). Biomed Pharmacother. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(01\)00068-3](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(01)00068-3)
- Erlich, S., Alexandrovich, A., Shohami, E., & Pinkas-Kramarski, R. (2007). Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. *Neurobiology of Disease*, 26(1), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.003>
- Fan, B., Wei, Z., Yao, X., Shi, G., Cheng, X., Zhou, X., Zhou, H., Ning, G., Kong, X., & Feng, S. (2018). Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury. In *Cell Transplantation* (Vol. 27, Issue 6, pp. 853–866). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/0963689718755778>
- Fehlings, M. G., Vaccaro, A. R., & Boakye, M. (2012). *Essentials of Spinal Cord Injury: Basic Research to Clinical Practice*. Thieme. <https://books.google.es/books?id=aQC-sQOCzhQC>
- Fehlings, M. G., Vaccaro, A., Wilson, J. R., Singh, A., Cadotte, D. W., Harrop, J. S., Aarabi, B., Shaffrey, C., Dvorak, M., Fisher, C., Arnold, P., Massicotte, E. M., Lewis, S., & Rampersaud, R. (2012). Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: Results of the surgical timing in acute spinal cord injury study (STASCIS). *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032037>
- Feldman, M. E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z. A., Ruggero, D., & Shokat, K. M. (2009). Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biology*, 7(2), 0371–0383. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000038>
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J., & Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8204–8209. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502857102>

- Festoff, B. W., Ameenuddin, S., Arnold, P. M., Wong, A., Santacruz, K. S., & Citron, B. A. (2006). Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry*, 97(5), 1314–1326. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03799.x>
- Fischer, I., Dulin, J. N., & Lane, M. A. (2020). Transplanting neural progenitor cells to restore connectivity after spinal cord injury. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 21, Issue 7, pp. 366–383). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0314-2>
- Francos-Quijorna, I., Amo-Aparicio, J., Martinez-Muriana, A., & López-Vales, R. (2016). IL-4 drives microglia and macrophages toward a phenotype conducive for tissue repair and functional recovery after spinal cord injury. *GLIA*, 64(12), 2079–2092. <https://doi.org/10.1002/glia.23041>
- Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2006). mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Current Biology*, 16(18), 1865–1870. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.001>
- Garcia, E., Aguilar-Cevallos, J., Silva-Garcia, R., & Ibarra, A. (2016). Cytokine and growth factor activation in vivo and in vitro after spinal cord injury. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/9476020>
- Garg, N., Po, A., Miele, E., Campese, A. F., Begalli, F., Silvano, M., Infante, P., Capalbo, C., De Smaele, E., Canettieri, G., Di Marcotullio, L., Screpanti, I., Ferretti, E., & Gulino, A. (2013). MicroRNA-17-92 cluster is a direct Nanog target and controls neural stem cell through Trp53inp1. *EMBO Journal*, 32(21), 2819–2832. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.214>
- Gazdic, M., Volarevic, V., Randall Harrell, C., Fellabaum, C., Jovicic, N., Arsenijevic, N., & Stojkovic, M. (2018). Stem cells therapy for spinal cord injury. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19041039>
- Gensel, J. C., & Zhang, B. (2015). Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Research*, 1619, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.045>
- Gingras, A. C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S. K., Polakiewicz, R. D., Wyslouch-Cieszyńska, A., Aebersold, R., & Sonenberg, N. (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes and Development*, 15(21), 2852–2864. <https://doi.org/10.1101/gad.912401>
- Glaser, J., Gonzalez, R., Perreau, V. M., Cotman, C. W., & Keirstead, H. S. (2004). Neutralization of the chemokine CXCL10 enhances tissue sparing and angiogenesis

- following spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*, 77(5), 701–708.
<https://doi.org/10.1002/jnr.20204>
- Goldshmit, Y., Kanner, S., Zacs, M., Frisca, F., Pinto, A. R., Currie, P. D., & Pinkas-Kramarski, R. (2015). Rapamycin increases neuronal survival, reduces inflammation and astrocyte proliferation after spinal cord injury. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 68, 82–91.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.04.006>
- Gómez-López, S., Wiskow, O., Favaro, R., Nicolis, S. K., Price, D. J., Pollard, S. M., & Smith, A. (2011). Sox2 and Pax6 maintain the proliferative and developmental potential of gliogenic neural stem cells in vitro. *GLIA*, 59(11), 1588–1599.
<https://doi.org/10.1002/glia.21201>
- Grochowski, C., Radzikowska, E., & Maciejewski, R. (2018). Neural stem cell therapy—Brief review. In *Clinical Neurology and Neurosurgery* (Vol. 173, pp. 8–14). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2018.07.013>
- Guerrero, A. R., Uchida, K., Nakajima, H., Watanabe, S., Nakamura, M., Johnson, W. E. B., & Baba, H. (2012). Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 533. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-40>
- Guptarak, J., Wanchoo, S., Durham-Lee, J., Wu, Y., Zivadinovic, D., Paulucci-Holthausen, A., & Nesic, O. (2013). Inhibition of IL-6 signaling: A novel therapeutic approach to treating spinal cord injury pain. *Pain*, 154(7), 1115–1128.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.03.026>
- Haar, E. Vander, Lee, S. il, Bandhakavi, S., Griffin, T. J., & Kim, D. H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology*, 9(3), 316–323. <https://doi.org/10.1038/ncb1547>
- Haissaguerre, M., Saucisse, N., & Cota, D. (2014). Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 397, Issues 1–2, pp. 67–77). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.07.015>
- Han, J., Wang, B., Xiao, Z., Gao, Y., Zhao, Y., Zhang, J., Chen, B., Wang, X., & Dai, J. (2008). Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(1), 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.06.003>
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K. ichi, Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., & Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110(2), 177–189. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00833-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00833-4)

- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., & Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature04724>
- Hartman, N. W., Lin, T. V., Zhang, L., Paquelet, G. E., Feliciano, D. M., & Bordey, A. (2013). MTORC1 Targets the Translational Repressor 4E-BP2, but Not S6 Kinase 1/2, to Regulate Neural Stem Cell Self-Renewal InVivo. *Cell Reports*, 5(2), 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.017>
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. In *Genes and Development* (Vol. 18, Issue 16, pp. 1926–1945). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.1212704>
- Hayta, E., & Elden, H. (2018). Acute spinal cord injury: A review of pathophysiology and potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs for pharmacological intervention. In *Journal of Chemical Neuroanatomy* (Vol. 87, pp. 25–31). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.08.001>
- He, H., Dang, Y., Dai, F., Guo, Z., Wu, J., She, X., Pei, Y., Chen, Y., Ling, W., Wu, C., Zhao, S., Liu, J. O., & Yu, L. (2003). Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 29278–29287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303800200>
- Hellenbrand, D. J., Roddick, R. M., Mauney, S. M., Elder, R. T., Morehouse, C. N., & Hanna, A. S. (2021). The Role of Interleukins after Spinal Cord Injury. In *Interleukins - The Immune and Non-Immune Systems' Related Cytokines*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96293>
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 32, pp. 121–130). Curr Opin Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>
- Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., & Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, 123(4), 569–580. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.024>
- Hsieh, A. C., Costa, M., Zollo, O., Davis, C., Feldman, M. E., Testa, J. R., Meyuhis, O., Shokat, K. M., & Ruggero, D. (2010). Genetic Dissection of the Oncogenic mTOR Pathway Reveals Druggable Addiction to Translational Control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell*, 17(3), 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.021>

- Hu, J., Yang, Z., Li, X., & Lu, H. (2016). C-C motif chemokine ligand 20 regulates neuroinflammation following spinal cord injury via Th17 cell recruitment. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0630-7>
- Huang, K., & Fingar, D. C. (2014). Growing knowledge of the mTOR signaling network. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 36, pp. 79–90). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.09.011>
- Hurst, S. M., Wilkinson, T. S., McLoughlin, R. M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G. M., Topley, N., & Jones, S. A. (2001). IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*, 14(6), 705–714. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00151-0)
- Ihrie, R. A., & Alvarez-Buylla, A. (2008). Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 331, Issue 1, pp. 179–191). Cell Tissue Res. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0461-z>
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M. A., Hall, A., & Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, 6(11), 1122–1128. <https://doi.org/10.1038/ncb1183>
- Jiang, Y. P., Ballou, L. M., & Lin, R. Z. (2001). Rapamycin-insensitive Regulation of 4E-BP1 in Regenerating Rat Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10943–10951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007758200>
- Jones, T. B. (2014). Lymphocytes and autoimmunity after spinal cord injury. In *Experimental Neurology* (Vol. 258, pp. 78–90). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.03.003>
- Julien, L.-A., Carriere, A., Moreau, J., & Roux, P. P. (2010). mTORC1-Activated S6K1 Phosphorylates Rictor on Threonine 1135 and Regulates mTORC2 Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 30(4), 908–921. <https://doi.org/10.1128/mcb.00601-09>
- Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D. H. (2010). MTOR regulation of autophagy. In *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 7, pp. 1287–1295). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO Journal*, 19(21), 5720–5728. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>
- Kabu, S., Gao, Y., Kwon, B. K., & Labhasetwar, V. (2015). Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. In *Journal of Controlled Release*

- (Vol. 219, pp. 141–154). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.060>
- Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S. I., Natsume, T., & Mizushima, N. (2010). Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 285(26), 20109–20116. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121699>
- Kanno, H., Ozawa, H., Sekiguchi, A., Yamaya, S., & Itoi, E. (2011). Induction of autophagy and autophagic cell death in damaged neural tissue after acute spinal cord injury in mice. *Spine*, 36(22), E1427-1434. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182028c3a>
- Kanno, H., Ozawa, H., Sekiguchi, A., Yamaya, S., Tateda, S., Yahata, K., & Itoi, E. (2012). The role of mTOR signaling pathway in spinal cord injury. In *Cell Cycle* (Vol. 11, Issue 17, pp. 3175–3179). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.21262>
- Karova, K., Wainwright, J. V., MacHova-Urdzikova, L., Pisal, R. V., Schmidt, M., Jendelova, P., & Jhanwar-Uniyal, M. (2019). Transplantation of neural precursors generated from spinal progenitor cells reduces inflammation in spinal cord injury via NF-κB pathway inhibition 11 Medical and Health Sciences 1107 Immunology. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1394-7>
- Kennedy, B. K., & Lamming, D. W. (2016). The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand ConducTOR of Metabolism and Aging. In *Cell Metabolism* (Vol. 23, Issue 6, pp. 990–1003). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.009>
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110(2), 163–175. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00808-5)
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kim, K. K., Adelstein, R. S., & Kawamoto, S. (2009). Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31052–31061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052969>
- Kjell, J., & Olson, L. (2016). Rat models of spinal cord injury: From pathology to potential therapies. In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 9, Issue 10, pp. 1125–1137). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dmm.025833>
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. In *Science* (Vol. 290, Issue 5497, pp. 1717–1721). Science. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1717>

- Kong, X., & Gao, J. (2017). Macrophage polarization: a key event in the secondary phase of acute spinal cord injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(5), 941–954. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13034>
- Kumamaru, H., Kadoya, K., Adler, A. F., Takashima, Y., Graham, L., Coppola, G., & Tuszynski, M. H. (2018). Generation and post-injury integration of human spinal cord neural stem cells. *Nature Methods* 2018 15:9, 15(9), 723–731. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0074-3>
- Kwon, B. K., Mann, C., Sohn, H. M., Hilibrand, A. S., Phillips, F. M., Wang, J. C., & Fehlings, M. G. (2008). Hypothermia for spinal cord injury. In *Spine Journal* (Vol. 8, Issue 6, pp. 859–874). Spine J. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2007.12.006>
- Kwon, B. K., Roy, J., Lee, J. H. T., Okon, E., Zhang, H., Marx, J. C., & Kindy, M. S. (2009). Magnesium chloride in a polyethylene glycol formulation as a neuroprotective therapy for acute spinal cord injury: Preclinical refinement and optimization. *Journal of Neurotrauma*, 26(8), 1379–1393. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.0884>
- Kwon, B. K., Streijger, F., Hill, C. E., Anderson, A. J., Bacon, M., Beattie, M. S., Blesch, A., Bradbury, E. J., Brown, A., Bresnahan, J. C., Case, C. C., Colburn, R. W., David, S., Fawcett, J. W., Ferguson, A. R., Fischer, I., Floyd, C. L., Gensel, J. C., Houle, J. D., ... Tetzlaff, W. (2015). Large animal and primate models of spinal cord injury for the testing of novel therapies. *Experimental Neurology*, 269, 154–168. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.04.008>
- Lamming, D. W., Ye, L., Katajisto, P., Goncalves, M. D., Saitoh, M., Stevens, D. M., Davis, J. G., Salmon, A. B., Richardson, A., Ahima, R. S., Guertin, D. A., Sabatini, D. M., & Baur, J. A. (2012). Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*, 335(6076), 1638–1643. <https://doi.org/10.1126/science.1215135>
- Laplane, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(20), 3589–3594. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>
- Laplane, M., & Sabatini, D. M. (2012). MTOR signaling in growth control and disease. In *Cell* (Vol. 149, Issue 2, pp. 274–293). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Le, W., Wei, F. X., Cen, J. S., Ping, S. N., Li, Z. Q., Chen, N. N., Cui, S. Bin, Wan, Y., & Liu, S. Y. (2014). Early administration of tumor necrosis factor-alpha antagonist promotes survival of transplanted neural stem cells and axon myelination after spinal cord injury in rats. *Brain Research*, 1575, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.05.038>
- Lee, D. Y. (2015). Roles of mTOR Signaling in Brain Development. *Experimental Neurobiology*, 24(3), 177–185. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.3.177>

- Lee, J. E., Lim, M. S., Park, J. H., Park, C. H., & Koh, H. C. (2016a). S6K Promotes Dopaminergic Neuronal Differentiation Through PI3K/Akt/mTOR-Dependent Signaling Pathways in Human Neural Stem Cells. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 3771–3782. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9325-9>
- Lee, J. E., Lim, M. S., Park, J. H., Park, C. H., & Koh, H. C. (2016b). PTEN Promotes Dopaminergic Neuronal Differentiation Through Regulation of ERK-Dependent Inhibition of S6K Signaling in Human Neural Stem Cells. *STEM CELLS Translational Medicine*, 5(10), 1319–1329. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0200>
- Lee, S. I., Jeong, S. R., Kang, Y. M., Han, D. H., Jin, B. K., Namgung, U., & Kim, B. G. (2010). Endogenous expression of interleukin-4 regulates macrophage activation and confines cavity formation after traumatic spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*, 88(11), 2409–2419. <https://doi.org/10.1002/jnr.22411>
- Li, X., Chen, W., Sheng, J., Cao, D., & Wang, W. (2014). Interleukin-6 inhibits voltage-gated sodium channel activity of cultured rat spinal cord neurons. *Acta Neuropsychiatrica*, 26(3), 170–177. <https://doi.org/10.1017/neu.2013.49>
- Li, X. G., Du, J. H., Lu, Y., & Lin, X. J. (2019). Neuroprotective effects of rapamycin on spinal cord injury in rats by increasing autophagy and Akt signaling. *Neural Regeneration Research*, 14(4), 721–727. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.247476>
- Li, Y., Wang, C., Zhang, G., Wang, X., Duan, R., Gao, H., Peng, T., Teng, J., & Jia, Y. (2014). Role of autophagy and mTOR signaling in neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, 38(11), 1337–1343. <https://doi.org/10.1002/cbin.10320>
- Licausi, F., & Hartman, N. W. (2018). Role of mTOR complexes in neurogenesis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19051544>
- Lin, J., Huo, X., & Liu, X. (2017). “mTOR Signaling Pathway”: A Potential Target of Curcumin in the Treatment of Spinal Cord Injury. In *BioMed Research International* (Vol. 2017, pp. 1–7). <https://doi.org/10.1155/2017/1634801>
- Lin, M. S., Sun, Y. Y., Chiu, W. T., Hung, C. C., Chang, C. Y., Shie, F. S., Tsai, S. H., Lin, J. W., Hung, K. S., & Lee, Y. H. (2011). Curcumin attenuates the expression and secretion of RANTES after spinal cord injury in vivo and lipopolysaccharide-induced astrocyte reactivation in vitro. *Journal of Neurotrauma*, 28(7), 1259–1269. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.1768>
- Lipton, J. O., & Sahin, M. (2014). The Neurology of mTOR. In *Neuron* (Vol. 84, Issue 2, pp. 275–291). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.034>

- Liu, C., Zhong, Y., Apostolou, A., & Fang, S. (2013). Neural differentiation of human embryonic stem cells as an in vitro tool for the study of the expression patterns of the neuronal cytoskeleton during neurogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(1), 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.130>
- Liu, S., Sarkar, C., Dinizo, M., Faden, A. I., Koh, E. Y., Lipinski, M. M., & Wu, J. (2015). Disrupted autophagy after spinal cord injury is associated with ER stress and neuronal cell death. *Cell Death and Disease*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.527>
- Liu, W. M., Wu, J. Y., Li, F. C., & Chen, Q. X. (2011). Ion channel blockers and spinal cord injury. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 89, Issue 6, pp. 791–801). J Neurosci Res. <https://doi.org/10.1002/jnr.22602>
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., & Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell*, 10(3), 457–468. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00636-6)
- Long, H. Q., Li, G. S., Cheng, X., Xu, J. H., & Li, F. B. (2015). Role of hypoxia-induced VEGF in blood-spinal cord barrier disruption in chronic spinal cord injury. In *Chinese Journal of Traumatology - English Edition* (Vol. 18, Issue 5, pp. 293–295). Chin J Traumatol. <https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2015.08.004>
- Ma, T., Hoeffler, C. A., Capetillo-Zarate, E., Yu, F., Wong, H., Lin, M. T., Tampellini, D., Klann, E., Blitzer, R. D., & Gouras, G. K. (2010). Dysregulation of the mTOR Pathway Mediates Impairment of Synaptic Plasticity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 5(9), e12845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012845>
- Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 5, pp. 307–318). Nat Rev Mol Cell Biol. <https://doi.org/10.1038/nrm2672>
- Machova Urdzikova, L., Ruzicka, J., Karova, K., Kloudova, A., Svobodova, B., Amin, A., Dubisova, J., Schmidt, M., Kubinova, S., Jhanwar-Uniyal, M., & Jendelova, P. (2017). A green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate enhances neuroregeneration after spinal cord injury by altering levels of inflammatory cytokines. *Neuropharmacology*, 126, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.006>
- Mahoney, C., Feliciano, D. M., Bordey, A., & Hartman, N. W. (2016). Switching on mTORC1 induces neurogenesis but not proliferation in neural stem cells of young mice. *Neuroscience Letters*, 614, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.042>
- Manning, B. D. (2004). Balancing Akt with S6K: Implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 167, Issue 3, pp. 399–403). J Cell Biol.

- <https://doi.org/10.1083/jcb.200408161>
- Martino, G., Pluchino, S., Bonfanti, L., & Schwartz, M. (2011). Brain regeneration in physiology and pathology: The immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. In *Physiological Reviews* (Vol. 91, Issue 4, pp. 1281–1304). American Physiological Society Bethesda, MD. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2010>
- Martirosyan, N. L., Kalani, M. Y. S., Bichard, W. D., Baaj, A. A., Fernando Gonzalez, L., Preul, M. C., & Theodore, N. (2015). Cerebrospinal fluid drainage and induced hypertension improve spinal cord perfusion after acute spinal cord injury in pigs. *Neurosurgery*, 76(4), 461–468. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000000638>
- McKinley, W. O., Seel, R. T., & Hardman, J. T. (1999). Nontraumatic spinal cord injury: Incidence, epidemiology, and functional outcome. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 80(6), 619–623. [https://doi.org/10.1016/S0003-9993\(99\)90162-4](https://doi.org/10.1016/S0003-9993(99)90162-4)
- Meng, D., Frank, A. R., & Jewell, J. L. (2018). mTOR signaling in stem and progenitor cells. In *Development (Cambridge)* (Vol. 145, Issue 1). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.152595>
- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of cells and tissues. In *Cell* (Vol. 147, Issue 4, pp. 728–741). Cell. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. In *Nature* (Vol. 451, Issue 7182, pp. 1069–1075). Nature. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
- Moreno-Manzano, V., Rodriguez-Jimenez, F. J., Garcia-Rosello, M., Lainez, S., Erceg, S., Calvo, M. T., Ronaghi, M., Lloret, M., Planells-Cases, R., Sanchez-Puelles, J. M., & Stojkovic, M. (2009). Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function. *Stem Cells*, 27(3), 733–743. <https://doi.org/10.1002/stem.24>
- Mortazavi, M. M., Verma, K., Harmon, O. A., Griessenauer, C. J., Adeeb, N., Theodore, N., & Tubbs, R. S. (2015). The microanatomy of spinal cord injury: A review. In *Clinical Anatomy* (Vol. 28, Issue 1, pp. 27–36). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ca.22432>
- Mothe, A. J., Tam, R. Y., Zahir, T., Tator, C. H., & Shoichet, M. S. (2013). Repair of the injured spinal cord by transplantation of neural stem cells in a hyaluronan-based hydrogel. *Biomaterials*, 34(15), 3775–3783. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.002>
- Mukaino, M., Nakamura, M., Okada, S., Toyama, Y., Liu, M., & Okano, H. (2008). Role of IL-6 in regulation of inflammation and stem cell differentiation in CNS trauma. In *Nihon Rinshō Men'eki Gakkai kaishi = Japanese journal of clinical immunology* (Vol. 31, Issue 2, pp. 93–98). Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. <https://doi.org/10.2177/jsci.31.93>

- Mukaino, M., Nakamura, M., Yamada, O., Okada, S., Morikawa, S., Renault-Mihara, F., Iwanami, A., Ikegami, T., Ohsugi, Y., Tsuji, O., Katoh, H., Matsuzaki, Y., Toyama, Y., Liu, M., & Okano, H. (2010). Anti-IL-6-receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing microglia-dominant inflammation. *Experimental Neurology*, 224(2), 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.04.020>
- Mukhamedshina, Y. O., Akhmetzyanova, E. R., Martynova, E. V., Khaiboullina, S. F., Galieva, L. R., & Rizvanov, A. A. (2017). Systemic and Local Cytokine Profile following Spinal Cord Injury in Rats: A Multiplex Analysis. *Frontiers in Neurology*, 8(OCT), 581. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2017.00581>
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201–211. <https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>
- Nakamura, M., Okada, S., Toyama, Y., & Okano, H. (2005). Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2005 28:3, 28(3), 197–203. <https://doi.org/10.1385/CRIAI.28:3:197>
- Neil, J., Shannon, C., Mohan, A., Laurent, D., Murali, R., & Jhanwar-Uniyal, M. (2016). ATP-site binding inhibitor effectively targets mTORC1 and mTORC2 complexes in glioblastoma. *International Journal of Oncology*, 48(3), 1045–1052. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3311>
- Neirincx, V., Coste, C., Franzen, R., Gothot, A., Rogister, B., & Wislet, S. (2014). Neutrophil contribution to spinal cord injury and repair. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 11, Issue 1, p. 150). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0150-2>
- Ni, H., Jin, W., Zhu, T., Wang, J., Yuan, B., Jiang, J., Liang, W., & Ma, Z. (2015). Curcumin modulates TLR4/NF- κ B inflammatory signaling pathway following traumatic spinal cord injury in rats. *Journal of Spinal Cord Medicine*, 38(2), 199–206. <https://doi.org/10.1179/2045772313Y.0000000179>
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K. I., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., & Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15461–15464. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200665200>
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., & Maekawa, M. (2008). Concise Review: Pax6 Transcription Factor Contributes to both Embryonic and Adult Neurogenesis as a Multifunctional Regulator. *STEM CELLS*, 26(7), 1663–1672. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2007-0884>
- Ousman, S. S., & David, S. (2001). MIP-1 α , MCP-1, GM-CSF, and TNF- α control the immune

- cell response that mediates rapid phagocytosis of myelin from the adult mouse spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 21(13), 4649–4656. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-13-04649.2001>
- Oyinbo, C. A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: A nugget of this multiply cascade. In *Acta Neurobiologiae Experimentalis* (Vol. 71, Issue 2, pp. 281–299). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21731081/>
- Paliouras, G. N., Hamilton, L. K., Aumont, A., Joppé, S. E., Barnabé-Heider, F., & Fernandes, K. J. L. (2012). Mammalian target of rapamycin signaling is a key regulator of the transit-amplifying progenitor pool in the adult and aging forebrain. *Journal of Neuroscience*, 32(43), 15012–15026. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2248-12.2012>
- Papadopoli, D., Boulay, K., Kazak, L., Pollak, M., Mallette, F. A., Topisirovic, I., & Hulea, L. (2019). Mtor as a central regulator of lifespan and aging. *F1000Research*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17196.1>
- Pearce, L. R., Huang, X., Boudeau, J., Pawłowski, R., Wulschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A. F. M., Gurlay, R., Magnuson, M. A., & Alessi, D. R. (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochemical Journal*, 405(3), 513–522. <https://doi.org/10.1042/BJ20070540>
- Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. In *GLIA* (Vol. 50, Issue 4, pp. 427–434). Glia. <https://doi.org/10.1002/glia.20207>
- Pelisch, N., Almanza, J. R., Stehlik, K. E., Aperi, B. V., & Kroner, A. (2020). CCL3 contributes to secondary damage after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation* 2020 17:1, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12974-020-02037-3>
- Pereira, I. M., Marote, A., Salgado, A. J., & Silva, N. A. (2019). Filling the Gap: Neural Stem Cells as A Promising Therapy for Spinal Cord Injury. *Pharmaceuticals*, 12(2), 65. <https://doi.org/10.3390/ph12020065>
- Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S., & Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell*, 137(5), 873–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.046>
- Piper, D. R., Mujtaba, T., Keyoung, H., Roy, N. S., Goldman, S. A., Rao, M. S., & Lucero, M. T. (2001). Identification and characterization of neuronal precursors and their progeny from human fetal tissue. *Journal of Neuroscience Research*, 66(3), 356–368. <https://doi.org/10.1002/jnr.1228>
- Powell, J. D., Pollizzi, K. N., Heikamp, E. B., & Horton, M. R. (2012). Regulation of immune responses by mTOR. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 30, pp. 39–68). Annu Rev

- Immunol. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075024>
- Rabanal-Ruiz, Y., Otten, E. G., & Korolchuk, V. I. (2017). mTORC1 as the main gateway to autophagy. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 61, Issue 6, pp. 565–584). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/EBC20170027>
- Ramesh, G., Maclean, A. G., & Philipp, M. T. (2013). Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators of Inflammation*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/480739>
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O’Kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics*, 36(6), 585–595. <https://doi.org/10.1038/ng1362>
- Ray, S. K. (2020). Modulation of autophagy for neuroprotection and functional recovery in traumatic spinal cord injury. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 15, Issue 9, pp. 1601–1612). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.276322>
- Ren, H., Chen, X., Tian, M., Zhou, J., Ouyang, H., & Zhang, Z. (2018). Regulation of Inflammatory Cytokines for Spinal Cord Injury Repair Through Local Delivery of Therapeutic Agents. *Advanced Science*, 5(11), 1800529. <https://doi.org/10.1002/advs.201800529>
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707–1710. <https://doi.org/10.1126/science.1553558>
- Rizzino, A. (2009). Sox2 and Oct-3/4: A Versatile Pair of Master Regulators that Orchestrate the Self-renewal and Pluripotency of Embryonic Stem Cells by Functioning as Molecular Rheostats. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 1(2), 228. <https://doi.org/10.1002/WSBM.12>
- Ronaghi, M., Erceg, S., Moreno-Manzano, V., & Stojkovic, M. (2010). Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: Human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? In *Stem Cells* (Vol. 28, Issue 1, pp. 93–99). Stem Cells. <https://doi.org/10.1002/stem.253>
- Routhe, L. J., & Moos, T. (2015). Handling iron in restorative neuroscience. *Neural Regeneration Research*, 10(10), 1558–1559. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.165316>
- Ruzicka, J., Machova-Urdzikova, L., Gillick, J., Amemori, T., Romanyuk, N., Karova, K., Zaviskova, K., Dubisova, J., Kubinova, S., Murali, R., Sykova, E., Jhanwar-Uniyal, M., & Jendelova, P. (2017). A comparative study of three different types of stem cells for treatment of rat spinal cord injury. *Cell Transplantation*, 26(4), 585–603.

- <https://doi.org/10.3727/096368916X693671>
- Ruzicka, J., Romanyuk, N., Jirakova, K., Hejcl, A., Janouskova, O., Machova, L. U., Bochín, M., Pradny, M., Vargova, L., & Jendelova, P. (2019). The Effect of iPS-Derived Neural Progenitors Seeded on Laminin-Coated pHEMA-MOETACl Hydrogel with Dual Porosity in a Rat Model of Chronic Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*, 28(4), 400–412. <https://doi.org/10.1177/0963689718823705>
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78(1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90570-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90570-3)
- Sakai, K., Fukuda, T., & Iwadate, K. (2014). Immunohistochemical analysis of the ubiquitin proteasome system and autophagy lysosome system induced after traumatic intracranial injury: Association with time between the injury and death. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 35(1), 38–44. <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000067>
- Sakurai, K., & Osumi, N. (2008). The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 28(18), 4604–4612. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5074-07.2008>
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Molecular Cell*, 25(6), 903–915. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.003>
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L., & Sabatini, D. M. (2006). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, 22(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.029>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Schanne, F. A. X., Kane, A. B., Young, E. E., & Farber, J. L. (1979). Calcium dependence of toxic cell death: A final common pathway. *Science*, 206(4419), 700–702. <https://doi.org/10.1126/science.386513>
- Schmelzle, T., & Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. In *Cell* (Vol. 103, Issue 2, pp. 253–262). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00117-3)

- Sehgal, S. N., Baker, H., & Vézina, C. (1975). Rapamycin (Ay-22,989), a New Antifungal Antibiotic. II. Fermentation, Isolation and Characterization. *The Journal of Antibiotics*, 28(10), 727–732. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.727>
- Sekiguchi, A., Kanno, H., Ozawa, H., Yamaya, S., & Itoi, E. (2012). Rapamycin promotes autophagy and reduces neural tissue damage and locomotor impairment after spinal cord injury in mice. *Journal of Neurotrauma*, 29(5), 946–956. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.1919>
- Shen, Y., Tenney, A. P., Busch, S. A., Horn, K. P., Cuascut, F. X., Liu, K., He, Z., Silver, J., & Flanagan, J. G. (2009). PTP σ Is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science*, 326(5952), 592–596. <https://doi.org/10.1126/science.1178310>
- Siddiqui, A. M., Khazaei, M., & Fehlings, M. G. (2015). Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. In *Progress in Brain Research* (Vol. 218, pp. 15–54). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2014.12.007>
- Silva, N. A., Sousa, N., Reis, R. L., & Salgado, A. J. (2014). From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 114, pp. 25–57). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.002>
- Simard, J. M., Tsymbalyuk, O., Keledjian, K., Ivanov, A., Ivanova, S., & Gerzanich, V. (2012). Comparative effects of glibenclamide and riluzole in a rat model of severe cervical spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 233(1), 566–574. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.044>
- Skalecka, A., Liszewska, E., Bilinski, R., Gkogkas, C., Khoutorsky, A., Malik, A. R., Sonenberg, N., & Jaworski, J. (2016). mTOR kinase is needed for the development and stabilization of dendritic arbors in newly born olfactory bulb neurons. *Developmental Neurobiology*, 76(12), 1308–1327. <https://doi.org/10.1002/dneu.22392>
- Song, Y., Xue, H., Liu, T. ting, Liu, J. mei, & Chen, D. (2015). Rapamycin Plays a Neuroprotective Effect after Spinal Cord Injury via Anti-Inflammatory Effects. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 29(1), 29–34. <https://doi.org/10.1002/jbt.21603>
- Sontag, C. J., Nguyen, H. X., Kamei, N., Uchida, N., Anderson, A. J., & Cummings, B. J. (2013). Immunosuppressants Affect Human Neural Stem Cells In Vitro but Not in an In Vivo Model of Spinal Cord Injury. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2(10), 731–744. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0175>
- Spilman, P., Podlutska, N., Hart, M. J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R., & Galvan, V. (2011). Correction: Inhibition of mTOR by Rapamycin

- Abolishes Cognitive Deficits and Reduces Amyloid- β Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/annotation/05c1b976-7eab-4154-808d-0526e604b8eb>
- Stammers, A. T., Liu, J., & Kwon, B. K. (2012). Expression of inflammatory cytokines following acute spinal cord injury in a rodent model. *Journal of Neuroscience Research*, 90(4), 782–790. <https://doi.org/10.1002/jnr.22820>
- Stenudd, M., Sabelström, H., & Frisén, J. (2015). Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurology*, 72(2), 235–237. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.2927>
- Su, Z., Niu, W., Liu, M. L., Zou, Y., & Zhang, C. L. (2014). In vivo conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. *Nature Communications*, 5, 3338. <https://doi.org/10.1038/ncomms4338>
- Sun, Z., Hu, L., Wen, Y., Chen, K., Sun, Z., Yue, H., & Zhang, C. (2013). Adenosine triphosphate promotes locomotor recovery after spinal cord injury by activating mammalian target of rapamycin pathway in rats. *Neural Regeneration Research*, 8(2), 101–110. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.02.001>
- Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., & Jaworski, J. (2017). Molecular neurobiology of mTOR. In *Neuroscience* (Vol. 341, pp. 112–153). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>
- Tee, A. R., Sampson, J. R., Pal, D. K., & Bateman, J. M. (2016). The role of mTOR signalling in neurogenesis, insights from tuberous sclerosis complex. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 52, pp. 12–20). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2016.01.040>
- Thompson, C. D., Zurko, J. C., Hanna, B. F., Hellenbrand, D. J., & Hanna, A. (2013). The therapeutic role of interleukin-10 after spinal cord injury. In *Journal of Neurotrauma* (Vol. 30, Issue 15, pp. 1311–1324). J Neurotrauma. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2651>
- Trivedi, A., Olivas, A. D., & Noble-Haeusslein, L. J. (2006). Inflammation and spinal cord injury: Infiltrating leukocytes as determinants of injury and repair processes. *Clinical Neuroscience Research*, 6(5), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.cnr.2006.09.007>
- Urdžíková, L. M., Růžicka, J., LaBagnara, M., Kárová, K., Kubínová, Š., Jiráková, K., Murali, R., Syková, E., Jhanwar-Uniyal, M., & Jendelová, P. (2014). Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 11275–11293. <https://doi.org/10.3390/ijms150711275>
- Vanický, I., Urdžíková, L., Saganová, K., Čížková, D., & Gálik, J. (2001). A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat.

- Journal of Neurotrauma*, 18(12), 1399–1407. <https://doi.org/10.1089/08977150152725687>
- Vieira, M. S., Santos, A. K., Vasconcellos, R., Goulart, V. A. M., Parreira, R. C., Kihara, A. H., Ulrich, H., & Resende, R. R. (2018). Neural stem cell differentiation into mature neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Issue 7, pp. 1946–1970). Biotechnol Adv. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.002>
- Von Bohlen Und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 345, Issue 1, pp. 1–19). Cell Tissue Res. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1196-4>
- Walsh, J. T., Zheng, J., Smirnov, I., Lorenz, U., Tung, K., & Kipnis, J. (2014). Regulatory T Cells in Central Nervous System Injury: A Double-Edged Sword. *The Journal of Immunology*, 193(10), 5013–5022. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302401>
- Wan, X., Harkavy, B., Shen, N., Grohar, P., & Helman, L. J. (2007). Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*, 26(13), 1932–1940. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209990>
- Wander, S. A., Hennessy, B. T., & Slingerland, J. M. (2011). Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: How pathway complexity informs therapeutic strategy. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 121, Issue 4, pp. 1231–1241). J Clin Invest. <https://doi.org/10.1172/JCI44145>
- Wang, C. X., Olschowka, J. A., & Wrathall, J. R. (1997). Increase of interleukin-1 β mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. *Brain Research*, 759(2), 190–196. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00254-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00254-0)
- Wang, L., Harris, T. E., Roth, R. A., & Lawrence, J. C. (2007). PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 20036–20044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702376200>
- Wang, X., & Proud, C. G. (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. In *Physiology* (Vol. 21, Issue 5, pp. 362–369). Physiology (Bethesda). <https://doi.org/10.1152/physiol.00024.2006>
- Wang, Z. Y., Liu, W. G., Muharram, A., Wu, Z. Y., & Lin, J. H. (2014). Neuroprotective effects of autophagy induced by rapamycin in rat acute spinal cord injury model. *NeuroImmunoModulation*, 21(5), 257–267. <https://doi.org/10.1159/000357382>
- Weichhart, T. (2018). MTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. In *Gerontology* (Vol. 64, Issue 2, pp. 127–134). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000484629>
- Wilson, J. R., Forgione, N., & Fehlings, M. G. (2013). Emerging therapies for acute traumatic

- spinal cord injury. In *CMAJ* (Vol. 185, Issue 6, pp. 485–492). Canadian Medical Association. <https://doi.org/10.1503/cmaj.121206>
- Wilson, J. R., Tetreault, L. A., Kwon, B. K., Arnold, P. M., Mroz, T. E., Shaffrey, C., Harrop, J. S., Chapman, J. R., Casha, S., Skelly, A. C., Holmer, H. K., Brodt, E. D., & Fehlings, M. G. (2017). Timing of Decompression in Patients With Acute Spinal Cord Injury: A Systematic Review. In *Global Spine Journal* (Vol. 7, Issue 3_supplement, pp. 95S-115S). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/2192568217701716>
- Wulschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. In *Cell* (Vol. 124, Issue 3, pp. 471–484). Cell. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>
- Yang, G., Murashige, D. S., Humphrey, S. J., & James, D. E. (2015). A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Reports*, 12(6), 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.016>
- Yang, H., Rudge, D. G., Koos, J. D., Vaidialingam, B., Yang, H. J., & Pavletich, N. P. (2013). MTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, 497(7448), 217–223. <https://doi.org/10.1038/nature12122>
- Yang, L., Blumbergs, P. C., Jones, N. R., Manavis, J., Sarvestani, G. T., & Ghabriel, M. N. (2004). Early Expression and Cellular Localization of Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- α in Human Traumatic Spinal Cord Injury. *Spine*, 29(9), 966–971. <https://doi.org/10.1097/00007632-200405010-00004>
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: A history of macroautophagy. In *Nature Cell Biology* (Vol. 12, Issue 9, pp. 814–822). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-814>
- Yao, J., Mu, Y., & Gage, F. H. (2012). Neural stem cells: Mechanisms and modeling. In *Protein and Cell* (Vol. 3, Issue 4, pp. 251–261). Protein Cell. <https://doi.org/10.1007/s13238-012-2033-6>
- Yilmaz, T., & Kaptanoğlu, E. (2015). Current and future medical therapeutic strategies for the functional repair of spinal cord injury. *World Journal of Orthopedics*, 6(1), 42–55. <https://doi.org/10.5312/wjo.v6.i1.42>
- Yuan, Y. M., & He, C. (2013). The glial scar in spinal cord injury and repair. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 29, Issue 4, pp. 421–435). Neurosci Bull. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1358-3>
- Zacchetti, A., Van Garderen, E., Teske, E., Nederbragt, H., Dierendonck, J. H., & Rutteman, G. R. (2003). Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: Comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS*,

- 111(3), 430–438. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.t01-1-1110208.x>
- Zaveri, L., & Dhawan, J. (2018). Cycling to meet fate: Connecting pluripotency to the cell cycle. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 6, Issue JUN, p. 57). Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00057>
- Zhang, L., Tang, P., Hou, H., Zhang, L., Lan, X., Mao, Z., Liu, D., He, C., & Du, H. (2014). Autophagy reduces neuronal damage and promotes locomotor recovery via inhibition of apoptosis after spinal cord injury in rats. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 49, Issue 1, pp. 276–287). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8518-3>
- Zhang, Xi, He, X., Li, Q., Kong, X., Ou, Z., Zhang, L., Gong, Z., Long, D., Li, J., Zhang, M., Ji, W., Zhang, W., Xu, L., & Xuan, A. (2017). PI3K/AKT/mTOR Signaling Mediates Valproic Acid-Induced Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells through Epigenetic Modifications. *Stem Cell Reports*, 8(5), 1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.006>
- Zhang, Xin, Neganova, I., Przyborski, S., Yang, C., Cooke, M., Atkinson, S. P., Anyfantis, G., Fenyk, S., Keith, W. N., Hoare, S. F., Hughes, O., Strachan, T., Stojkovic, M., Hinds, P. W., Armstrong, L., & Lako, M. (2009). A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A. *Journal of Cell Biology*, 184(1), 67–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801009>
- Zhou, H. X., Li, X. Y., Li, F. Y., Liu, C., Liang, Z. P., Liu, S., Zhang, B., Wang, T. Y., Chu, T. C., Lu, L., Ning, G. Z., Kong, X. H., & Feng, S. Q. (2014). Targeting RPTP σ with lentiviral shRNA promotes neurites outgrowth of cortical neurons and improves functional recovery in a rat spinal cord contusion model. *Brain Research*, 1586, 46–63. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.08.048>
- Zhou, K., Sansur, C. A., Xu, H., & Jia, X. (2017). The temporal pattern, flux, and function of autophagy in spinal cord injury. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18020466>
- Zhou, X., He, X. J., & Ren, Y. (2014). Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 9, Issue 20, pp. 1787–1795). Editorial Board of Neural Regeneration Research. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.143423>
- Zhou, Y., Wang, Z., Li, J., Li, X., & Xiao, J. (2018). Fibroblast growth factors in the management of spinal cord injury. In *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 22, Issue 1, pp. 25–37). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13353>
- Zhou, Z., Peng, X., Insolera, R., Fink, D. J., & Mata, M. (2009). IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 220(1), 183–190.

- <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.018>
- Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., & Hall, M. N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*, 144(5), 757–768.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.014>
- Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 12, Issue 1, pp. 21–35). Nat Rev Mol Cell Biol. <https://doi.org/10.1038/nrm3025>
- Zong, S., Zeng, G., Fang, Y., Peng, J., Tao, Y., Li, K., & Zhao, J. (2014). The role of il-17 promotes spinal cord neuroinflammation via activation of the transcription factor stat3 after spinal cord injury in the rat. *Mediators of Inflammation*, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/786947>